

**FILIPE JOSÉ DE MATOS**

**EFEITO DO ESTRITO CONTROLE DA GLICEMIA SOBRE  
PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS EM ANIMAIS  
HIPERGLICÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Alexandra  
Susana Latini

Co-orientador: Prof.Dr. Alex Rafacho

**FLORIANÓPOLIS  
2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Matos, Filipe

Efeito do estrito controle da glicemia sobre parâmetros  
neuroquímicos em animais hiperglicêmicos [dissertação] /  
Filipe Matos ; orientadora, Alexandra Latini ; co-  
orientadora, Alex Rafacho. - Florianópolis, SC, 2013.  
77 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Toxicologia molecular. 3.  
Hiperglicemia. 4. Insulina. 5. Sistema nervoso central. I.  
Latini, Alexandra . II. Rafacho, Alex. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. IV. Título.

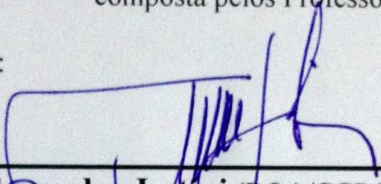
# **“Efeito do estrito controle da glicemia sobre parâmetros neuroquímicos em animais hiperglicêmicos”**

por

**FILIPE JOSÉ DE MATOS**

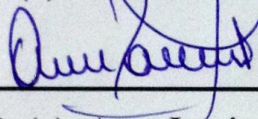
Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final pelos membros titulares da  
Banca Examinadora (Port.  
04/PPGBQA/2013) do Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica - UFSC,  
composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



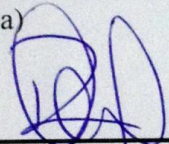
---

**Prof(a) Dr(a) Alexandra Latini** (BQA/CCB/UFSC)



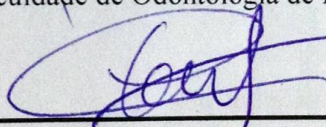
---

**Prof(a) Dr(a) Ana Lucia De Paul** (Centro de Microscopia  
Electrónica/Facultad de Ciências Médicas/ Universidad Nacional de  
Córdoba)



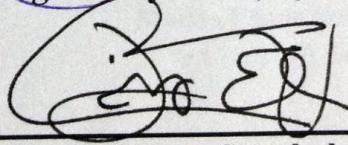
---

**Prof(a) Dr(a) Rodrigo Augusto da Silva** (Departamento de  
Histologia/Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP)



---

**Prof(a) Dr(a) Rodrigo Bairy Leal** (BQA/CCB/UFSC)



---

**Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2013.

Este trabalho é dedicado aos meus pais  
**Paulo Onildo de Matos,**  
**Marisa Eliane Strebe de Matos**  
e a meu avô **Eugênio Strebe**

## AGRADECIMENTOS

Agradecer é sempre uma tarefa difícil, pois muitas vezes, em meio aos agradecimentos, nós esquecemos de alguma pessoa importante em nossa caminhada. De antemão gostaria de pedir perdão àqueles que, por ventura eu esqueça neste momento; lembrando que a gratidão verdadeira não é aquela que se faz quando se escreve e sim aquela que se pratica; Primeiramente, agradeço a meus pais, Paulo Onildo de Matos e Marisa Eliane Strebe pelo apoio incondicional, por sempre me incentivar a crescer, estudar e estar buscando cada vez mais e melhor meus objetivos com ética e determinação, da mesma forma que sempre praticaram; A meus irmãos Paulo e Alexandre pelas lições de vida, pela convivência quase sempre feliz que tivemos, pela presença diária e por me dar a certeza de ter em quem confiar;

À minha orientadora Profa. Dra. Alexandra Latini que por diversas vezes pus sua paciência a prova, pelo acompanhamento contínuo, pela experiência, sabedoria e pela ajuda durante todo o processo; Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alex Rafacho pela ótima convivência e disponibilidade para me ajudar com suas valiosas sugestões, lições e cooperação de variadas formas durante este período;

Aos Professores da Pós-graduação em Bioquímica, por todos os conhecimentos repassados;

À Prof<sup>a</sup>. Ana Lucía De Paul e todos os membros do laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidad Nacional de Córdoba, serei eternamente grato por toda ajuda e dedicação durante meu estágio no exterior;

Agradeço a meus colegas de laboratório que tornaram-se grandes amigos, obrigado Aderbal, Ana Júlia, Débora, Priscila, Flávio, Lucila, Karina, Paulo, Roberta e Aline, que muito apoiou nos experimentos. Também agradeço a Viviane, que por muitas vezes me ajudou em minha caminhada acadêmica e por isso a considero minha terceira orientadora; Também agradeço aos amigos do Departamento de Bioquímica, Bianca, Jade, Daiane, Marcos e meu grande amigo Gianni. Obrigado pelos momentos de companheirismo e descontração;

Ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e aos seus secretários  
Ronaldo e Gustavo pela ajuda sempre prestada com total competência;  
Aos meus grandes amigos (anônimos, porém identificados na tábua do  
meu coração), cujos exemplos me fazem enxergar as muitas  
possibilidades do meu caminhar;  
À CAPES pelo apoio financeiro;

## RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia persistente, decorrente da falta de insulina e/ou da resistência dos tecidos à ação do hormônio. Estima-se que até o ano de 2030, cerca de 552 milhões de indivíduos no mundo estejam acometidos por esta doença. A alta morbidade e mortalidade característica desta condição estão fortemente associadas ao desenvolvimento de alterações patológicas na vasculatura. Estas alterações parecem estarem relacionadas com mudanças epigenéticas, que ocorrem nas fases iniciais do DM e favorecem a expressão patológica de determinados genes, provocando desta forma danos irreversíveis no organismo mesmo que a glicemia seja controlada posteriormente. Desta forma o objetivo deste trabalho foi melhor entender o efeito do estrito controle da glicemia, pela administração de insulina, em animais que desenvolveram hiperglicemia através da administração de estreptozotocina (STZ) sobre parâmetros metabólicos, alterações a nível de DNA, expressão gênica, sinalização celular de proteínas relacionadas à insulina, e conteúdo mitocondrial em sangue ou cérebro de ratos Wistar. Os resultados deste estudo mostraram que os animais que receberam STZ se tornaram hiperglicêmicos e hiperlipidêmicos por um marcado prejuízo na arquitetura das ilhotas de Langerhans, que como consequência provocou o comprometimento na síntese do hormônio insulina. Estas alterações metabólicas periféricas, que foram acompanhadas por uma marcada redução do peso corporal, desencadearam uma série de eventos no sistema nervoso central, principalmente evidenciados por *i*) redução na expressão genica hipocampal da insulina e da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10); *ii*) manutenção da fosforilação de proteínas alvos do receptor da insulina, como o substrato do receptor da insulina -1 (IRS-1) e Akt no córtex cerebral; *iii*) aumento no número de mitocôndrias no bulbo olfatório; e *iv*) hipermetilação do DNA em hipocampo. As alterações sobre a expressão de IL-10 e de hipermetilação no sistema nervoso central destes animais, foi prevenido/revertido com pela administração com insulina. A partir destes dados as seguintes conclusões podem ser formuladas: *i*) no cérebro existe um metabolismo de síntese, produção e sinalização de insulina independente do periférico e com objetivos diferentes; *ii*) o controle da glicemia mediante pela administração de insulina previne das alterações epigenéticas decorrentes da hipermetilação do DNA; *iii*) a melhor caracterização do modelo de

hiperglicemia induzido por STZ aqui realizada permitirá a sua utilização em diferentes desafios metabólicos.

**Palavras-chave:** hiperglicemia, hipermetilação do DNA, insulina, sistema nervoso central.



## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic syndrome of multiple etiologies characterized by persistent hyperglycemia resulting from lack of insulin and/or resistance of tissues to the hormone action. It is estimated that in 2030, nearly 552 million individuals in the world will be affected by this disease. The high morbidity and mortality characteristic of this entity are known to be strongly associated with the development of pathological changes in the vasculature. These changes seem to be related to epigenetic modulations, which occur in the initial stages of diabetes and promote the pathological expression of certain genes, thus resulting in irreversible damage in the organism, even when the blood glucose is subsequently controlled. In this scenario, the main objective of this project was to better understand the effect of the strict glycaemia control by the administration of insulin, on biochemical metabolic measurements, DNA methylation, genic expression and cell signaling of proteins related to insulin, and the content of mitochondria in blood or brain of streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic animals. It was here observed, that animals receiving STZ showed an altered islets of Langerhans architecture that provoked reduced blood insulin concentration, hyperglycemia and hyperlipidemia, and marked bodyweight lost. These peripheral chronic metabolic alterations elicited a series of events in the central nervous system (CNS) characterized by: *i*) reduced gene expression of hippocampal insulin and interleukin-10 (IL-10); *ii*) correct phosphorylation of target proteins of the insulin receptors, including insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and Akt in the cerebral cortex; *iii*) increased number of mitochondria in the olfactory bulbs; and *iv*) increased DNA methylation in hippocampus. The alterations linked to reduced IL-10 expression and DNA methylation were significantly prevented and/or reverted by the exogenous insulin. According to these data, the following conclusions could be formulated: *i*) there is a peripheral independent insulin metabolism in the CNS, with specific objectives for insulin synthesis, maturation and signaling; *ii*) the insulin-induced control of hyperglycemia prevents from epigenetic alterations; *iii*) this better characterization of the STZ-induced hyperglycemia animal model will allow further utilization for different metabolic challenges.

**Keywords:** hyperglycemia, DNA hypermethylation, insulin, central nervous system.

## LISTA DE FIGURAS

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 1</b> | Esquema ilustrativo das células das ilhotas de Langerhans.....  | 20 |
| <b>Figura 2</b> | Estrutura da insulina biologicamente ativa (A). Processamento proteolítico da pré-pró-insulina em insulina madura e peptídeo C (B).....   | 21 |
| <b>Figura 3</b> | Secreção de insulina pelas células $\beta$ pancreáticas.....  | 22 |
| <b>Figura 4</b> | Processos induzidos pela sinalização intracelular da insulina.....  | 24 |
| <b>Figura 5</b> | Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin®N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a massa corporal (A), e morfologia das ilhotas de Langerhans (B) de ratos Wistar machos adultos.....                             | 38 |
| <b>Figura 6</b> | Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin®N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre o perfil metabólico de ratos Wistar machos adultos....   | 40 |
| <b>Figura 7</b> | Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin®N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a insulinemia (A) e a resistência sistêmica à insulina (B) em ratos Wistar machos adultos.....                                   | 41 |
| <b>Figura 8</b> | Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin®N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a relação do conteúdo das proteínas substrato do receptor de insulina (IRS-1; A) e Akt (B), nas formas total e fosforiladas..... | 42 |

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 9</b>  | Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin®N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a expressão relativa dos genes que codificam para as proteínas insulina-1 (A), IL-10 (B), BDNF (C), CK (D) e COXI (subunidade do complexo IV da cadeia respiratória; E) em hipocampo de ratos Wistar..... | 44 |
| <b>Figura 10</b> | Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin®N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a metilação global do DNA em hipocampo (A), cerebelo (B) e estriado (C) de ratos Wistar machos adultos.....   | 45 |
| <b>Figura 11</b> | Efeito in vivo da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin®N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea) sobre o conteúdo mitocondrial em bulbo olfatório de ratos Wistar.....  | 47 |

## LISTA DE ESQUEMAS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Esquema 1</b> | Desenho experimental. Indução de hiperglicemia pela administração de estreptozotocina (STZ) e protocolo de administração de insulina em ratos Wistar adultos machos..... | 32 |
|------------------|--|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADP** - Adenosina difosfato  
**Akt** - Proteína cinase serina-treonina  
**ATP** - Adenosina trifosfato  
**BDNF** - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro  
**BHE** - Barreira hematoencefálica  
**CK** - Creatina cuinase  
**COXI** - Citocromo *c* oxidase subunidade I  
**CPT1** - Carnitina palmitoil transferase 1  
**CT** - Colesterol total  
**DM** - Diabetes mellitus  
**DM 1** - Diabetes mellitus tipo 1  
**DM 2** - Diabetes mellitus tipo 2  
**DM 3** - Diabetes mellitus tipo 3  
**DNMTs** - DNA metiltransferases  
**gDNA** - DNA genômico  
**HDL** - Lipoproteína de alta densidade  
**HOMA** - *Homeostatic model assessment*  
**HOMA-IR** - *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*  
**IL-10** - Interleucina 10  
**IL-6** - Interleucina 6  
**IL-6** - Interleucina 1 $\beta$   
**INS** - Insulina  
**IRS** - Substratos do receptor de insulina  
**JAK-2** - *Janus cinase 2*  
**PI3K** - Fosfatidilinositol 3-cinase  
**PKB** - Proteína cinase B.  
**RI** - Resistência à insulina  
**SNC** – Sistema nervoso central  
**SHC** - *Src homology collagen*  
**STZ** – Estreptozotocina  
**Tfam** – Fator de transcrição A mitocondrial  
**UDP-GlcNAc** - UDP-N-acetilglicosamina  
**VLDL** - Lipoproteínas de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>1.1</b>   | <b>DIABETES MELLITUS.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>1.2</b>   | <b>HORMÔNIO INSULINA.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>1.2.1</b> | <b>Síntese de insulina pelo pâncreas endócrino.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>1.2.2</b> | <b>Secreção de insulina.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>1.2.3</b> | <b>Efeitos celulares desencadeados pela insulina.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>1.2.4</b> | <b>Síntese de insulina no SNC.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>1.3</b>   | <b>EPIGENÉTICA.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>1.3.1</b> | <b>Epigenética e DM.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>2.1</b>   | <b>OBJETIVO GERAL.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>2.2</b>   | <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>3</b>     | <b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>4</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>4.1</b>   | <b>Animais.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>4.2</b>   | <b>Modelo experimental de DM.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>4.3</b>   | <b>Preparação das amostras.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4.4</b>   | <b>Perfil metabólico.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4.5</b>   | <b>Determinação de parâmetros de biologia molecular....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4.6</b>   | <b>Determinação de PCR quantitativa em tempo real.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>4.7</b>   | <b>Determinações por microscopia eletrônica.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>4.8</b>   | <b>Obtenção do DNA e análise do perfil de metilação global.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>4.9</b>   | <b>Determinação de proteínas.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>4.10</b>  | <b>Análise estatística.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>5.1</b>   | <b>Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre a massa corporal e arquitetura das ilhotas de Langerhans em ratos Wistar adultos.....</b>      | <b>37</b> |
| <b>5.2</b>   | <b>Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre a glicemia, perfil lipídico plasmático, insulinemia e HOMA-IR em ratos Wistar adultos.....</b> | <b>39</b> |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.3   | Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre a sinalização mediada pela insulina em córtex cerebral de ratos Wistar adultos.....   | 42 |
| 5.4   | Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre a expressão dos genes que codificam para insulina-1, CK, IL-10, BDNF e de proteínas envolvidas na cadeia respiratória em hipocampo de ratos Wistar adultos..... | 43 |
| 5.5   | Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre o perfil de metilação global do DNA em hipocampo, córtex cerebral e bulbo olfatório de ratos Wistar adultos.....  | 43 |
| 5.6   | RESULTADOS PRELIMINARES.....   | 46 |
| 5.6.1 | Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre o conteúdo mitocondrial em bulbo olfatório de ratos Wistar adultos.....   | 46 |
| 6     | DISCUSSÃO.....   | 48 |
| 6.1   | Novas contribuições e características do modelo de hiperglicemia induzido pela administração de STZ....  | 50 |
| 6.1.1 | <i>Massa corporal e arquitetura do pâncreas endócrino.....</i>   | 50 |
| 6.1.2 | <i>Perfil lipídico.....</i>  | 51 |
| 6.1.3 | <i>Produção de insulina na periferia e no SNC.....</i>   | 52 |
| 6.1.4 | <i>Efeitos desencadeados no SNC pela ausência de insulina pancreática e o papel da insulina exógena.....</i>   | 54 |
| 6.1.5 | <i>Mecanismos moleculares envolvidos nos eventos centrais decorrentes da ausência de insulina periférica..</i>   | 57 |
| 7     | CONSLUSÃO.....   | 59 |
| 8     | PERSPECTIVAS.....  | 59 |
|       | REFERÊNCIAS.....   | 60 |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla caracterizada por um estado de hiperglicemia persistente decorrente da falta de insulina e/ou da resistência dos tecidos à ação do hormônio (HAN et al., 2007; MALECKI e SKUPIEN, 2008).

De acordo com o comitê executivo para diagnóstico e classificação do DM da “American Diabetes Association” (ADA, 2012; SEQUIST et al., 2012) e o Consenso Brasileiro sobre Diabetes (2002), esta síndrome pode surgir de forma secundária a alguma doença que provoque a destruição das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, como por exemplo, tumores, patologias endócrinas, defeitos genéticos e funcionais das células  $\beta$  ou na ação da insulina. No entanto, as formas mais comuns de DM resultam de alterações primárias no sistema sinalizador deste hormônio. Tais alterações podem ser classificadas em duas categorias: DM tipo 1 e DM tipo 2.

O DM 1 manifesta-se geralmente durante a infância e caracteriza-se por uma severa ou total ausência de insulina, estando comumente associada a processos autoimunes que afetam a funcionalidade das células  $\beta$  do pâncreas (ATKINSON e EISENBARTH, 2001; MALECKI e KLUPA, 2005). Evidências propõem que o caráter hereditário do DM 1 está relacionado com a expressão de genes reguladores da produção de anticorpos contra células  $\beta$  pancreáticas (MOORE et al., 2009).

O DM 2 é a forma mais frequente que afeta aproximadamente 90% da população diabética. A prevalência desta doença vem aumentando exponencialmente em vários países, particularmente naqueles em desenvolvimento, representando um importante problema de saúde pública. Em termos mundiais, em 1985 estimava-se que existissem 30 milhões de adultos com DM, com projeções de atingir 552 milhões de pacientes com diabetes mellitus em 2030 (ADA, 2012), dos quais dois terços destes pacientes, pertencem a países em desenvolvimento. No Brasil, 5,6% da população padece a doença e há um aumento de acordo com a faixa etária: 21,6% dos brasileiros com mais de 65 anos possuem a doença. O número de brasileiros com diabetes em 2000 era de 4,6 milhões e a estimativa para 2030 é de que esse número ultrapasse 11 milhões de pessoas. No entanto, estas projeções já foram ultrapassadas, haja vista que em dezembro de 2012 o número de diabéticos no Brasil foi estimado em



aproximadamente 10 milhões (VIGITEL, 2011; WILD et al., 2004). O DM 2 é caracterizado por ser um distúrbio multifatorial, incluindo fatores genéticos e ambientais, e que geralmente resulta de graus variáveis de resistência tecidual à insulina, e/ou de uma deficiência relativa na secreção do hormônio pelas células  $\beta$  (MALECKI e KLUPA, 2005). Esta forma é observada em adultos e a hiperglicemia, na maioria dos casos, pode ser controlada através de dieta apropriada e agentes hipoglicemiantes orais (KOWLURU e ODENBACH, 2004; MORINI et al., 2004).

A resistência tecidual à ação da insulina observada nos pacientes acometidos por DM 2 pode ser quantificada através de um índice denominado *homeostatic model assessment* (HOMA), descrito inicialmente em 1985 por Matthews e colaboradores (MATTHEWS et al., 1985). Este índice reflete a capacidade do organismo na manutenção da normoglicemia, capacidade que depende principalmente da atividade funcional das células  $\beta$  pancreáticas em secretar insulina e da sensibilidade tecidual à ação da insulina (MATTHEWS, 2001). De acordo com estes conceitos, o índice HOMA pode ser calculado mediante a estimativa da resistência à insulina (RI), na qual o índice HOMA-RI está representado pelas concentrações plasmáticas de insulina e glicose em jejum:

**HOMA-RI = insulinemia de jejum (mU/L) x glicemia de jejum (mmol/L)/22,5**

onde 22,5 representa a correção dos valores normais de glicose (4,5 mM) multiplicado pelo valor normal de insulina (5  $\mu$ U/mL).

Como mencionado previamente, o DM 2 é uma condição multifatorial que se encontra associada a uma alta morbidade e mortalidade, principalmente pelo desenvolvimento de alterações patológicas na vasculatura (WINER e SOWERS, 2004). A vasculopatia pode afetar micro e macrovasos. As complicações microvasculares incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia central e periférica; as macrovasculares, doença coronária precipitada por aterosclerose, doença vascular periférica, infarto e amputações dos membros inferiores (BRADFORD et al., 2007; BROWNLEE, 2001; WIROSTKO et al., 2008; ZIMMET et al., 2001). Grandes estudos randômicos têm claramente demonstrado que o eficiente e imediato controle glicêmico em etapas precoces da doença podem promover a diminuição das complicações vasculares (THE ACTION TO CONTROL CARDIOVASCULAR RISK IN DIABETES STUDY GROUP, 2008;

THE ADVANCE COLLABORATIVE GROUP, 2008; THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993). Desta forma, se o controle glicêmico não for inicial e não tiver tempo de duração adequado (pelo menos cinco anos), as complicações macro e microvasculares não poderão ser prevenidas apropriadamente. Estes achados levaram a pesquisadores a definir este fenômeno como “memória metabólica” (CERIELLO et al., 2009; IHNAT et al., 2006; NATHAN et al., 2005).

A condição clínica de resistência à insulina representa a inabilidade do hormônio na promoção da homeostase da glicose (WANG et al., 2004). O desenvolvimento da resistência à insulina resulta em hiperinsulinemia compensatória, um estado que é mantido inicialmente até ocorrer defeitos na secreção pancreática (CEFALU, 2001). As principais consequências estão relacionadas com o metabolismo de lipídios e proteínas, no transporte de íons e aminoácidos, na síntese de óxido nítrico e na diferenciação, proliferação e ciclo celular (WANG et al., 2004). Além disso, a resistência à insulina também está associada com a hipertensão, dislipidemias, doença arteriais, doença aterosclerótica, aumento da retenção renal de sódio, aumento da taxa de parada cardíaca (CEFALU, 2001; PATRO e MONTANER, 2011; SANDHOFER et al., 2007), sendo, portanto, um fator de risco para doenças cardiovasculares (TANIGUCHI et al., 2000) e do sistema nervoso central (SNC) (BRAVATA et al., 2004).

A insulina pancreática tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica para agir em distintas regiões do cérebro modulando funções como crescimento e sobrevivência neuronal, modulação da expressão de numerosos genes, metabolismo, síntese de proteínas formação da sinapse e plasticidade neuronal (D'ERCOLE et al., 1996; JELLINGER, 2006; MARTIN et al., 2012). A alteração da sinalização insulínica tem sido associada com o risco de desenvolver demência e/ou alterações cognitivas (HILDRETH et al., 2012; OHARA et al., 2011; YAFFE et al., 2004). Neste contexto, a doença neurodegenerativa de Alzheimer é a causa mais comum de demência em pacientes com DM ou resistência à insulina (RITCHIE e LOVESTONE, 2002). Estudos recentes relatam que a administração de insulina no SNC ativa mecanismos de plasticidade neuronal e desta forma, melhorara a performance cognitiva em modelos de animais com doença de Alzheimer (DE FELICE et al., 2009; WATSON et al., 2005). Outros estudos têm demonstrado que quando animais de experimentação são submetidos a uma dieta hipercalórica para induzir resistência à insulina, existe um

aumento na produção do peptídeo  $\beta$  amiloide e na formação de emaranhados neurofibrilares, achados neuropatológicos desta doença neurodegenerativa, além de apresentarem as alterações cognitivas e demência que caracterizam a doença de Alzheimer, (ASHE, 2000). Baseado neste e em outros dados, alguns autores têm classificado a doença de Alzheimer como DM 3 devido aos mecanismos patológicos da doença se corresponderem com o estado de resistência crônica à insulina no cérebro (DE LA MONTE e WANDS, 2008).

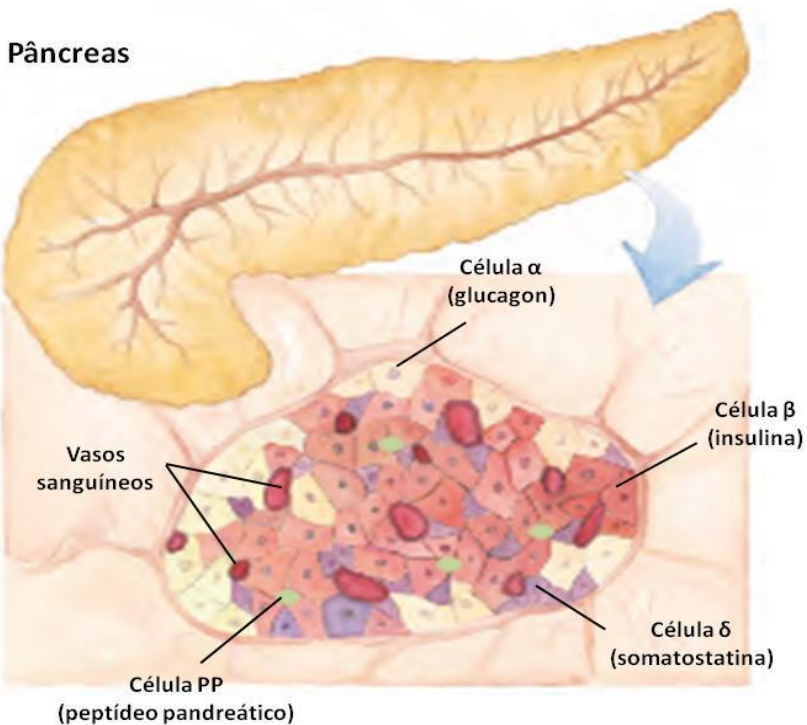
## 1.2 HORMÔNIO INSULINA

### 1.2.1 Síntese de insulina pelo pâncreas endócrino

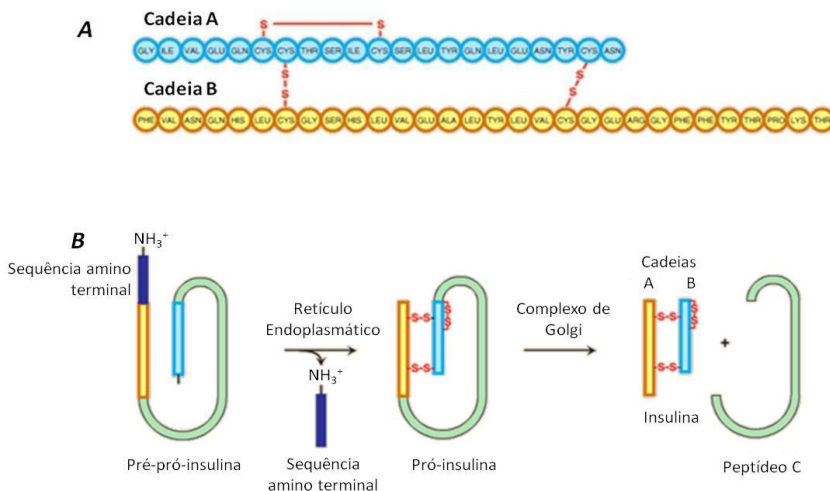
A síntese de insulina ocorre nas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas, o qual é um órgão que possui tanto função exócrina, por secretar o suco pancreático que contém enzimas digestivas, quanto endócrina por produzir além do hormônio insulina, o glucagon e a somatostatina. As ilhotas são compostas principalmente por quatro tipos celulares: as  $\beta$  que constituem cerca de 60% de todas as células, as quais se situam principalmente no núcleo das ilhotas e secretam insulina; as células  $\alpha$  que correspondem cerca de 25% do total das células pancreáticas e secretam glucagon; as  $\delta$  que constituem cerca de 10% do total e que secretam somatostatina; e em menor proporção as células PP produtoras de polipeptídeo pancreático (Figura 1). A relação entre estes diferentes tipos celulares permite o controle direto da secreção de alguns dos hormônios pelos demais hormônios. Por exemplo, a insulina inibe a secreção de glucagon, enquanto que a somatostatina inibe a secreção de insulina e glucagon (GUYTON, 2006; LEHNINGER et al., 2004).

A insulina com atividade biológica é uma proteína pequena composta por duas cadeias polipeptídicas, A e B, unidas por duas pontes dissulfeto (Figura 2A). O hormônio é sintetizado no retículo endoplasmático como um precursor inativo de uma única cadeia polipeptídica denominado de pré-pró-insulina, o qual possui uma sequência específica na porção amino terminal que dirige sua passagem para as vesículas secretoras (Figura 2B). A remoção proteolítica desta sequência amino terminal e a formação de três pontes dissulfeto produzem a pró-insulina, a qual é estocada em grânulos no complexo de Golgi. A elevação de glicose provoca a secreção de insulina, e a pró-

insulina é convertida por proteases específicas em insulina madura e peptídeo C, os quais são liberados na circulação. O peptídeo C é liberado em quantidades equimolares à insulina madura, sendo este, portanto, um excelente indicador da produção endógena de insulina, principalmente em indivíduos que se encontram sob terapia exógena com insulina (LEHNINGER et al., 2004).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo das células das ilhotas de Langerhans. As ilhotas de Langerhans são compostas por quatro tipos celulares, as  $\beta$  que secretam insulina, as  $\alpha$  que secretam glucagon, as  $\delta$  que secretam somatostatina e as PP que são produtoras do polipeptídeo pancreático. Adaptado de (LEHNINGER et al., 2004).

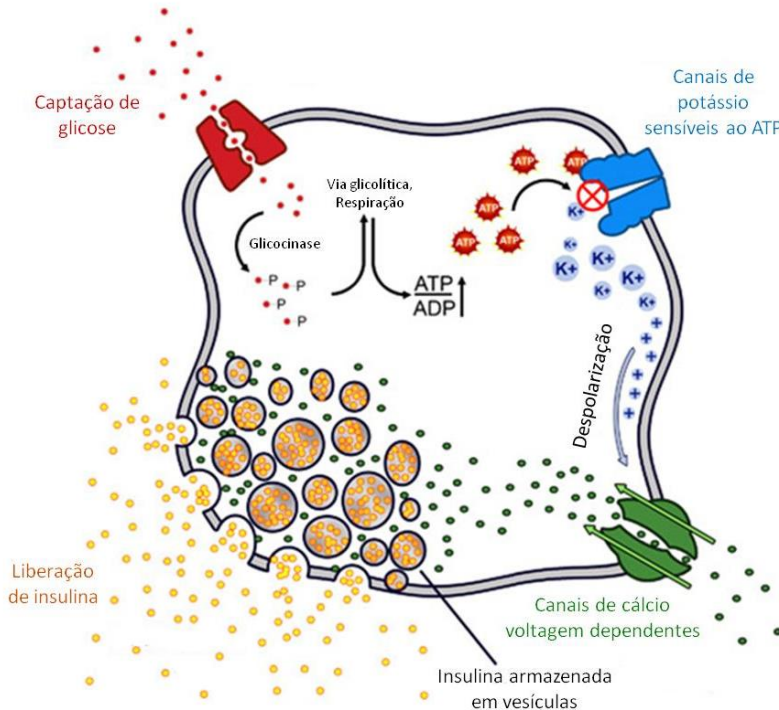


**Figura 2.** Estrutura da insulina biologicamente ativa (A). Processamento proteolítico da pré-pró-insulina em insulina madura e peptídeo C (B). A insulina é sintetizada no retículo endoplasmático na forma de um precursor inativo denominado de pré-pró-insulina, e estocado em vesículas no complexo de Golgi na forma de pró-insulina. Com a elevação da glicose, a pró-insulina é convertida por proteases específicas em insulina madura e peptídeo C, os quais são liberados na circulação. Adaptado de (LEHNINGER et al., 2004).

### 1.2.2 Secreção de insulina

A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pela célula  $\beta$  pancreática, sendo a glicose o mais importante. A glicose é transportada para dentro da célula  $\beta$  através de uma proteína integral de membrana denominada GLUT2, a qual também está presente em outros tecidos como rins, fígado e intestino. Após sua entrada na célula, a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato dando início à via glicolítica para subsequente geração de ATP. O aumento nas concentrações intracelulares de ATP, torna elevada a relação ATP/ADP, fecha os canais de potássio controlados por ATP provocando a despolarização da membrana celular. Este evento promove a abertura de canais dependentes de voltagem facilitando a entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  que ativam a migração dos grânulos de insulina para a membrana plasmática para posterior extrusão do seu conteúdo

(MARCHETTI et al., 2008; OOSAWA et al., 1992; RORSMAN e RENSTROM, 2003) (Figura 3).



**Figura 3.** Secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. A glicose é transportada para o interior da célula  $\beta$  através do GLUT2. Posteriormente é fosforilada, dando início a via glicolítica com subsequente geração de ATP. O aumento nas concentrações intracelulares de ATP bloqueia os canais de potássio e provoca a despolarização da membrana, promovendo a entrada de íons  $Ca^{2+}$ . Este processo estimula a migração dos grânulos que contêm insulina para a membrana plasmática para extrusão de seu conteúdo.

Adaptado de [http://ciitn.missouri.edu/cgi-bin/pub\\_view\\_project\\_ind.cgi?g\\_num=11&c\\_id=2007009](http://ciitn.missouri.edu/cgi-bin/pub_view_project_ind.cgi?g_num=11&c_id=2007009). Consultado em 3 de fevereiro de 2013.

### 1.2.3 Efeitos celulares desencadeados pela insulina

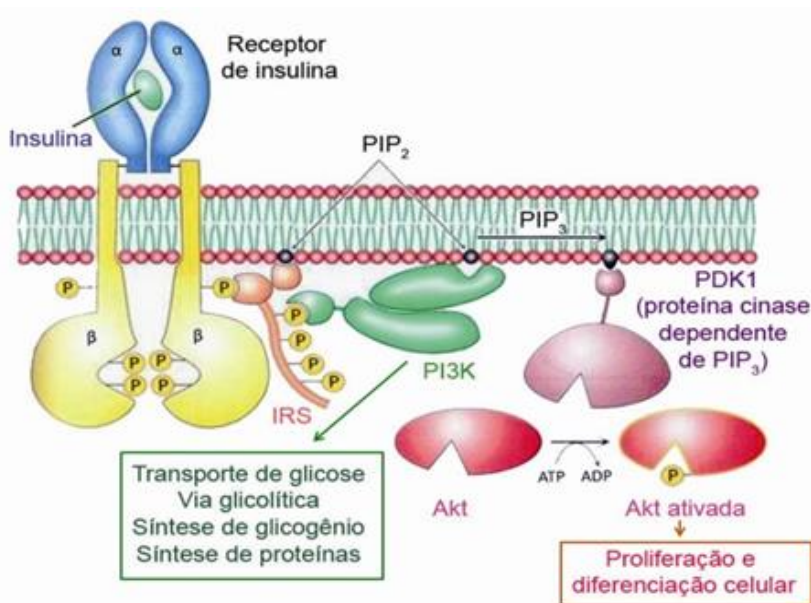
A insulina promove um estado anabólico por conduzir o metabolismo em direção ao armazenamento de carboidratos, lipídeos e a síntese de proteínas. Seus três principais tecidos alvo são o hepático, muscular e adiposo. No fígado, a insulina estimula tanto a glicólise quanto a síntese de glicogênio. Ao mesmo tempo, ela suprime a lipólise e promove a síntese de ácidos graxos de cadeia longa (lipogênese). Os lipídeos são empacotados nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que são secretadas para o sangue. Nos tecidos periféricos, a insulina induz a lipoproteína lipase, uma enzima que libera triacilglicerol tanto de VLDL hepática quanto de quilomícrons da dieta, a partir da hidrólise destes em glicerol e ácidos graxos. No tecido adiposo, este hormônio também estimula a síntese de triacilglicerol a partir de glicerol-3-fosfato e ácidos graxos. No músculo, a insulina estimula o transporte de glicose, o metabolismo de glicose e a síntese de glicogênio. Ainda, este hormônio aumenta a captação celular de aminoácidos e estimula a síntese de proteínas e inibe a degradação destas (BAYNES E DOMINICZAK, 2007).

Os efeitos celulares anabólicos acima descritos da insulina são desencadeados através da sua interação com receptores específicos localizados na superfície celular. O receptor da insulina está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas concentrações variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas (WHITE e KAHN, 1994).

A sinalização intracelular da insulina inicia através da interação da mesma com seu receptor específico de membrana, o receptor da insulina. O receptor de insulina é uma proteína heterotetramétrica com atividade tirosina quinase, composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$  ligadas por pontes dissulfeto (Figura 4). A subunidade  $\alpha$  possui o domínio de ligação da insulina, enquanto que a subunidade  $\beta$  possui a atividade de tirosina quinase que é estimulada pela interação da insulina com o receptor (Figura 4) (LEHNINGER et al., 2004; SALTIEL e KAHN, 2001).

A subunidade  $\alpha$  é extracelular e contém o sítio de ligação da insulina, enquanto a subunidade  $\beta$  é uma proteína transmembrana com atividade tirosina cinase (KASUGA et al., 1982). O receptor de insulina uma vez ativado por autofosforilação fosforila diversos substratos intracelulares, entre eles as proteínas conhecidas como substratos do

receptor de insulina (IRS-1-4), SHC (Src homology collagen) e JAK-2. A fosforilação dos IRSs provoca a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína quinase serina-treonina (Akt), entre outras (PRADA et al., 2005). A ativação da PI3K está relacionada com o transporte de glicose, via glicolítica, síntese de glicogênio e síntese de proteínas, enquanto que a Akt está associada à proliferação e diferenciação celular (COMBETTES-SOUVERAIN e ISSAD, 1998).



**Figura 4.** Processos induzidos pela sinalização intracelular da insulina. A insulina liga na subunidade α do receptor de insulina. Esta interação provoca a fosforilação da subunidade β, a qual possui atividade intrínseca de tirosina quinase. Desta forma, ocorre a fosforilação dos substratos do receptor de insulina, os quais ativam algumas vias de sinalização, incluindo a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína quinase serina-treonina (Akt). Adaptado de (BERG ET AL., 2007)



### 1.2.4 Síntese de insulina no SNC

Alguns trabalhos na literatura sugerem que a insulina também pode ser sintetizada por células no sistema nervoso. A detecção do mRNA da préproinsulina I e II e também da presença e secreção de insulina madura foi evidenciada em cérebro de roedores e em cultura de neurônios. Também foi evidenciada a presença de insulina no retículo endoplasmático, complexo de Golgi, axônios, dendritos e sinapses em neurônios através do uso de anticorpos específicos acoplados a partículas de ouro por microscopia eletrônica (MACHIDA et al., 2012; SCHECHTER et al., 1999; SCHECHTER et al., 1994; SCHECHTER et al., 1998; STRATHDEE et al., 1996; ZHAO et al., 1999).

A insulina cerebral está representada pela síntese *de novo* do hormônio (DEVASKAR et al., 1994; SCHECHTER et al., 1996) e principalmente pela insulina produzida no pâncreas, a qual é transportada através da barreira hematoencefálica (BANKS, 2004; BANKS et al., 1997; BASKIN et al., 1987; BAURA et al., 1993). A síntese de insulina foi demonstrada no bulbo olfatório, córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo, amígdala e septo (BASKIN et al., 1987; HAVRANKOVA et al., 1978; UNGER et al., 1991). A presença de receptores de insulina em astrócitos e neurônios foi observada na substância negra, hipocampo, gânglios basais, bulbo olfatório, córtex frontal e córtex médio temporal de roedores (ABBOTT et al., 1999; BASKIN et al., 1987; LANG e LOZANO, 1998; SINGH et al., 1997; UNGER et al., 1991). Alguns trabalhos tem sugerido que devido à localização da insulina no hipocampo e córtex médio temporal, esta pode ter importante papel na consolidação da memória e aprendizado (SINGH et al., 1997).

## 1.3 EPIGENÉTICA

O termo epigenética foi introduzido primeiramente por Conrad Waddington na década de 1940 para descrever as interações dos genes com o ambiente e sua responsabilidade pela expressão do fenótipo. Estudos primordiais em epigenética realizados por Murrell e colaboradores (2005) descreveram a heterocromatina como regiões do genoma que apresentam baixa densidade gênica. Subsequentemente observou-se que modificações em certos padrões de metilações do DNA e de histonas, estão associadas com a heterocromatina e eucromatina. Isto

levou a definir que um “código epigenético” determina o estado da cromatina e consequentemente à expressão e alterações de atividades gênicas específicas. Recentes estudos demonstraram que a epigenética também desempenha papel importante em eventos como a biologia do câncer, infecções virais, atividade de elementos transponíveis, terapia gênica somática, desenvolvimento de anormalidades e saúde mental (EGGER et al., 2004; SZYF et al., 2004).

De modo geral, os principais mecanismos epigenéticos são representados basicamente pela metilação do DNA e pelas modificações das proteínas (BERNSTEIN et al., 2007; DUCASSE e BROWN, 2006; ESTELLER, 2008; MAIER e OLEK, 2002). A metilação do DNA consiste na adição do radical metil no carbono 5 do anel pirimídico da base citosina seguida da base guanina, ou seja, em pontos conhecidos como dinucleotídeos CpG (BERNSTEIN et al., 2007). Esse processo é catalisado e mantido num estado hereditário por um grupo de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs) (ADCOCK et al., 2006; DUCASSE e BROWN, 2006). O genoma contém aproximadamente 30.000 ilhas CpG e as mesmas são preferencialmente encontradas na região promotora dos genes (LOPEZ et al., 2009). Estima-se que mais de 80% dos dinucleotídeos CpG encontram-se metilados no genoma dos mamíferos, enquanto que as regiões de CpG não metiladas estão localizadas principalmente em regiões promotoras de genes constitutivamente ativos ou induzíveis.

As alterações no padrão de metilação do DNA, estão representadas por hipermetilação e hipometilação. Estas alterações têm sido observadas em doenças relacionadas com o envelhecimento, doenças autoimunes como o diabetes e o câncer. Hipermetilação significa o aumento da metilação das ilhas CpG (LAIRD, 2003). A hipermetilação na sequência promotora dos genes reprime a transcrição gênica, incluindo a transcrição de genes supressores tumorais (MACDONALD e KLURFELD, 2002). O decréscimo do conteúdo de 5-metilcitosinas isto é, a hipometilação do DNA, é um evento inicial na maioria dos cânceres em animais e seres humanos (JOHANNING et al., 2002).

### **1.3.1 Epigenética e DM**

Nos últimos anos, tem sido proposto que alterações no padrão de metilação do DNA na região do gene promotor da insulina estaria relacionada com alterações na regulação da transcrição genica nas células

$\beta$  pancreáticas. Estas alterações parecem ainda estar intimamente relacionadas com os mecanismos patofisiológicos do DM (FRADIN et al., 2012; KURODA et al., 2009; TODD, 2010). Estes novos conceitos são apoiados em estudos que demonstraram uma estreita relação entre o estrito controle da glicemia e uma menor incidência de complicações micro e macrovasculares em pacientes com DM (BROWNLEE, 2001; WIROSTKO et al., 2008; ZIMMET et al., 2001). Estudos clínicos com mais de 6.000 pacientes examinados durante vinte anos demonstrou que o melhor controle glicêmico poderia evitar as complicações tanto micro quanto macrovasculares causadas pela doença (CERIELLO et al., 2009; IHNAT et al., 2006; NATHAN et al., 2005). Também foi observado que os efeitos deletérios causados pela hiperglicemia são vistos logo nos primeiros anos da doença e podem persistir por um longo período, os quais não poderão ser revertidos a menos que o controle glicêmico seja iniciado nos estágios mais precoces da doença (THE ACTION TO CONTROL CARDIOVASCULAR RISK IN DIABETES STUDY GROUP, 2008; THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993). Neste cenário, surge o conceito de “*memória metabólica*”, onde a hiperglicemia como consequência da falha de sinalização da insulina induziria efeitos deletérios de longa duração, os quais não poderão ser revertidos a menos que o controle glicêmico seja iniciado nos estágios mais precoces da doença (CERIELLO et al., 2009; IHNAT et al., 2006; NATHAN et al., 2005). Estas alterações nas fases iniciais do DM parecem estarem relacionadas com mudanças epigenéticas favorecendo a modulação patológica da expressão de determinados genes (MIAO et al., 2004), provocando desta forma danos irreversíveis no organismo mesmo que a glicemia seja controlada posteriormente.

Pesquisas de epigenéticas e DM realizadas em culturas celulares e em animais demonstraram que uma única situação de hiperglicemia pode provocar alterações epigenéticas duradouras, que favorecem a expressão de genes patológicos, incluindo o da região promotora do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, as que podem ser prevenidas pelo uso de antioxidantes mitocondriais (EL-OSTA et al., 2008). Estas alterações na expressão gênica foram confirmadas quando foi demonstrado uma redução na expressão do gene PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$ ), coativador que controla a fisiologia mitocondrial e o metabolismo energético (MOOTHA et al., 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral melhor entender o efeito do controle estrito da glicemia sobre parâmetros neuroquímicos em animais hiperglicêmicos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos serão investigados em sangue e cérebro de animais submetidos a hiperglicemia crônica induzida pela administração de STZ, e em animais com glicemia normalizada pela administração de insulina. As estruturas cerebrais empregadas para a análise corresponderam a hipocampo, córtex cerebral, bulbo olfatório e estriado, que são os locais descritos com maior produção cerebral de insulina (DEVASKAR et al., 1994; FICK e BELSHAM, 2010).

Foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Investigar a produção endógena de insulina após a administração de STZ mediante a determinação da concentração de insulina, e da expressão gênica (conteúdo de mRNA) de insulina, no sangue e no hipocampo, respectivamente;
- b) Mensurar a modulação da expressão dos genes que codificam para as proteínas creatina cinase (CK), interleucina-10 (IL-10), BDNF, COXI em hipocampo;
- c) Mensurar a relação do conteúdo proteico total versus fosforilado do substrato do receptor de insulina IRS-1 em córtex cerebral e hipocampo;
- d) Identificar o perfil metabólico mediante a determinação das concentrações de glicose e perfil lipídico (HDL-colesterol, colesterol total, triglicerídeos) em plasma, além da mensuração do ganho das massa de animais;
- e) Investigar os efeitos da hiperglicemia crônica a nível de DNA, através da determinação da metilação global do DNA em hipocampo de animais hiperglicêmicos.
- f) Investigar a morfologia e conteúdo mitocondrial em cérebro dos animais.

### 3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O DM é uma doença que vem aumentando exponencialmente em vários países, particularmente naqueles em desenvolvimento, sendo que para o ano de 2030 está previsto que 552 milhões de indivíduos no mundo estejam acometidos por esta síndrome, representando um grave problema de saúde pública. Recentemente foi demonstrado que a hiperglicemia pode modular positivamente a expressão de genes pró-inflamatórios e que esse efeito persiste, ainda que as concentrações de glicose sanguínea sejam normalizadas. A partir deste e outros dados da literatura, principalmente baseados em “trials” clínicos, surge o conceito de memória metabólica, o qual suporta a ideia de que o controle hiperglicêmico nos estágios mais precoces seria crucial para prevenir as complicações desenvolvidas nos estágios mais avançados da doença.

A partir disto, pretende-se entender como o efeito da hiperglicemia crônica e do controle precoce desta, através da administração de insulina, pode modular a expressão e quantidade de proteínas relacionadas com as alterações dos níveis glicêmicos, em um modelo crônico de hiperglicemia induzido pela administração de estreptozotocina. Desta forma, um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos durante a hiperglicemia crônica representará um avanço para a descoberta de estratégias terapêuticas eficazes que consigam prevenir ou atenuar as severas complicações decorrentes desta enfermidade.

Portanto, este estudo suporta a hipótese de que o estrito e precoce controle da glicemia evitaria mudanças no padrão de metilação do DNA provocados pela hiperglicemia crônica, preveniria alterações moleculares duradouras que poderiam comprometer o correto funcionamento do SNC.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram empregados ratos Wistar machos com 60 dias com massa de 250-300g obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Após a indução da hiperglicemia com STZ, os animais foram mantidos em caixas de plástico individuais, no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, em ciclo claro-escuro de  $\pm 12$  horas a uma temperatura de  $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Os animais tiveram livre acesso à água e à ração comercial, exceto nos dias em que houveram dosagens de glicemia, onde os mesmos permaneceram em jejum por 6 horas.

Todos os procedimentos experimentais foram executados de acordo com o “Guia de Princípios para o uso de Animais em Toxicologia” adotado pela sociedade de toxicologia em Julho de 1989. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais – CEUA, da UFSC (PP000350/CEUA).

### 4.2 Modelo experimental de DM

Os modelos de diabetes experimental em animais de laboratório têm sido amplamente utilizados para simular o diabetes mellitus da população. O modelo pode ser induzido por hormônios ou substâncias químicas como a aloxana ou estreptozotocina (STZ) que provocam lesões irreversíveis nas células  $\beta$  pancreáticas, as quais deixam de produzir a insulina, tornando o animal hiperglicêmico (ELLIOTT et al., 1997).

Neste trabalho empregou-se o modelo de hiperglicemia induzido pela administração de STZ. Para desenvolvê-lo empregou-se 105 ratos machos, onde 84 animais receberam uma dose de 55 mg/kg de STZ intraperitonealmente com jejum prévio de 14 horas, e os outros 21 animais que formaram o grupo controle, receberam através da mesma via de administração, tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,5 (veículo) (GULEN e DINCER, 2007). Após este procedimento, os animais receberam água contendo 5% de glicose durante 24 horas, para evitar morte por choque hipoglicêmico. Após esse período, foi disponibilizado água da torneira e ração comercial *ad libitum*. Durante todo o tratamento, os animais foram pesados periodicamente.

Três dias após a administração de STZ, com jejum prévio de 6 horas, foi determinada a glicemia de jejum dos animais. Para a

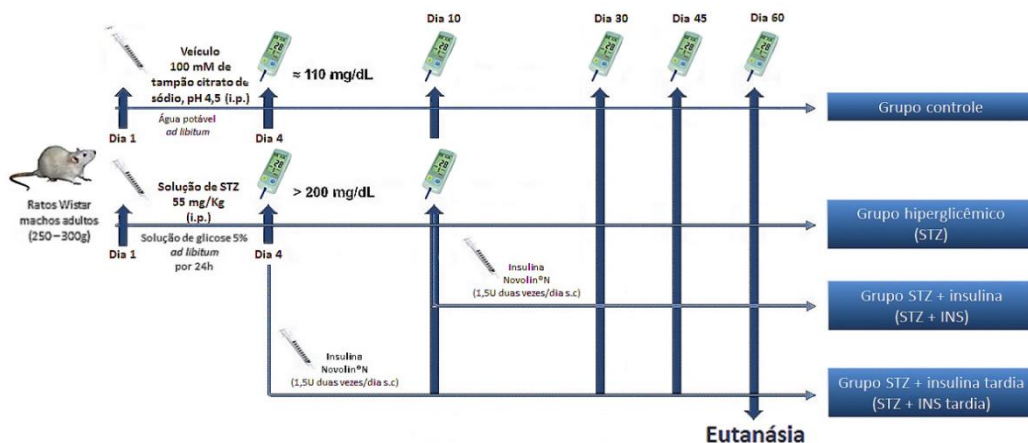
determinação da mesma, foi empregado sangue da cauda e as concentrações de glicose determinadas através do método da glicose oxidase usando o autoanalisador Optium™ Xceed (Abbott). Os animais que apresentaram glicemia maior que 200 mg/dL foram considerados hiperglicêmicos e imediatamente separados em três grupos. Um grupo permaneceu hiperglicêmico por 60 dias, o outro permaneceu hiperglicêmico durante os 10 primeiros dias e a partir disto recebeu insulina até o término do tratamento, enquanto que o terceiro grupo foi tratado com insulina logo após a confirmação de hiperglicemia. O hormônio foi administrado na dose de 1,5 UI de insulina humana NPH Novolin®N duas vezes ao dia com o objetivo de normalizar os níveis de glicose sanguínea (REMOR et al., 2011). Assim ficaram determinados os seguintes grupos experimentais (Esquema 1):

**Grupo Controle:** recebeu uma única injeção intraperitoneal de veículo;

**Grupo STZ:** recebeu uma única injeção intraperitoneal de STZ;

**Grupo STZ + INS:** recebeu uma única injeção intraperitoneal de STZ, e logo após a indução da hiperglicemia recebeu diariamente insulina 1,5 UI a cada 12 horas;

**Grupo STZ + INS tardia:** recebeu uma única injeção intraperitoneal de STZ, e dez dias após a indução da hiperglicemia recebeu diariamente insulina 1,5 UI a cada 12 horas.



**Esquema 1.** Desenho experimental. Indução de hiperglicemia pela administração de estreptozotocina (STZ) e protocolo de administração de insulina em ratos Wistar adultos machos. Para detalhes ver M&M.

### 4.3 Preparação das amostras

Após 60 dias de tratamento, os animais foram anestesiados em ambiente adequado (capela) com cetamina (80 mg/kg) / xilazina (20 mg/kg) por via intraperitoneal e posteriormente procedeu-se a coleta de sangue e a eutanásia. Em seguida o cérebro e o pâncreas foram rapidamente dissecados e mantidos em freezer -86°C para posterior determinação de parâmetros bioquímicos, de biologia molecular e *western blotting*. As determinações de perfil metabólico foram realizadas em amostras de sangue coletadas pelo método da punção da veia sublingual (DIEHL et al., 2001).

### 4.4 Perfil metabólico

A determinação do perfil lipídico plasmático foi realizada através da medida das concentrações de colesterol total (CT), colesterol da fração HDL e triglicerídeos no plasma de ratos. Estas análises foram determinadas utilizando kits comerciais (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as especificações do fabricante. Da mesma forma,



para a determinação de insulina no plasma foi utilizado kit comercial (AlphaLISA Insulin Kit – Perkin Elmer).

#### **4.5 Determinação por Western Blotting**

Após a remoção do cérebro, o córtex cerebral foi dissecado e processado utilizando tampão de lise contendo 10 mM de tampão fosfato salina, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,5% de desoxicolato de sódio, 0,1% de Nonidet P-40 (octilfenoxi-polieteroxi-etanol) e submetidos à eletroforese em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida (10%), sendo posteriormente transferidos para a membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond<sup>TM</sup>-C Extra). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado (5%) por 1 hora e posteriormente incubada com o anticorpo primário anti-IRS1 total (diluição 1:150), anti-p-IRS1 (diluição 1:250), anti-Akt (diluição 1:1000), anti-p-Akt (diluição 1:1000), anti- $\alpha$ -tubulina (diluição 1:1000) por 12 horas a 4°C. A visualização das proteínas foram realizadas utilizando o anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase (diluição 1:2.500) por 1 hora (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e as bandas com reatividade anti-IRS1 total, anti-p-IRS1, anti-Akt e anti- $\alpha$ -tubulina foram visualizadas através do uso de kit de quimiluminescência (Amersham EDL Plus<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents) e filme radiográfico (Amersham Hyperfilm EDL), segundo recomendações do fabricante (CACERES et al., 2010). Os valores referentes a intensidade das bandas foram corrigidas pelos valores da  $\alpha$ -tubulina, a qual, foi utilizada como controle de endógeno positivo

#### **4.6 Determinação de PCR quantitativa em tempo real**

O isolamento de RNA total foi realizado a partir de amostras de hipocampo como descrito por Jiang e colaboradores (JIANG et al, 2010). A determinação da expressão de mRNA de insulina-1 (forma de insulina expressa em maior quantidade no pâncreas e hipocampo ratos), Creatina Quinase (CK), Interleucina-10 (IL-10), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), Citocromo *c* oxidase subunidade I (COXI) e  $\beta$ -actina, foi realizada no sistema ABI Prism 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA) com a utilização de SYBR Green PCR Master Mix após a transcrição reversa de 1 $\mu$ g de RNA (JIANG et al, 2010). A sequência utilizada dos primers foram:

Insulina-1:

5'-CGTTGATTAAGTCCCTGCCCTT-3' (forward)

5'- TCAAGTTCGACCGTCTTCTCA-3' (reverse).

Creatina Quinase (CK):

5'-CTACGTGCTGAGCTCGCGGG-3' (forward)

5'- CCAGGCGGTCAGCGTTGGAG-3' (reverse)

Interleucina-10 (IL-10):

5'-GCCAAGCCTTGTTCAGAAATGA-3' (forward)

5'-TTTCTGGGCCATGGTTCTCT-3' (reverse)

Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF):

5'- AAGGCTGCAGGGGCATAGAC -3' (forward)

5'- TGAACCGCCAGCCAATTCTC -3' (reverse)

Citocromo *c* oxidase subunidade I (COXI):

5'- TAGCCTGGGCTGGA ACTAGA -3' (forward)

5'- TGTGTGTTTGGCATGGACT -3' (reverse)

$\beta$ -actina:

5'- GCG TCC ACC CGC GAG TAC AAC -3' (forward)

5'- CGA CGA CGA GCG CAG CGA TA -3' (reverse)

#### 4.7 Determinações por microscopia eletrônica

Após o término dos diferentes tratamentos *in vivo*, os animais foram perfundidos com solução de salina 0,9 %. Posteriormente, o pâncreas e o cérebro foram removidos e imersos em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% contendo cacodilato 0,1 M. O material permaneceu nesta solução durante quatro horas a 4 ° C e posteriormente foram submetidas a três lavagens de 30 minutos em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4. O material foi posteriormente tratado com tetróxido de osmio 1% e desidratado em concentrações crescentes de acetona (50; 75; 90 e 2 vezes em 100% durante 15 minutos) e posteriormente imerso em solução contendo partes iguais de resina epóxica araldita e cetona, por 2h. Posteriormente, as peças foram imersas em resina pura e polimerizadas a 60°C por 48 horas para posterior microtomia, a qual foi realizada em ultramicrotomo na espessura de 80 - 100 nm (DE PAUL et al., 2002). A morfologia das células  $\beta$  das secções de pâncreas foram obtidas a partir de cortes semifinos corados com azul de toluidina e observados em microscópio óptico em uma magnificação de 400X. A contagem do conteúdo mitocondrial em bulbo olfatório foi realizada em cortes ultrafinos com uma magnificação de 10.000X. Estes

experimentos foram realizados em colaboração com o grupo dos pesquisadores da Profa. Dra. Ana Lucía De Paul do Centro de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Médicas - Universidad Nacional de Córdoba.

#### 4.8 Obtenção do DNA e análise do perfil de metilação global

Amostras de hipocampo, cerebelo e estriado foram homogeneizadas em tampão de extração (10 mM Tris HCl pH 7,8, 5 mM EDTA, 0,5% SDS) e armazenadas a -20 °C. O DNA genômico (gDNA) foi extraído pela digestão com proteína K (20 mg/mL), seguida pelo método de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (TREVILATO e LINE, 2000). A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ( $\geq 1,8$ ) e OD 260/230 ( $\geq 1,0$ ) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

A metilação global do DNA foi avaliada pela digestão do DNA genômico (gDNA) pelas enzimas *HpaII* e *MspI*, as quais possuem o mesmo sítio de restrição (CCGG). No entanto, apenas a enzima *HpaII* é sensível à metilação da molécula do DNA. As reações de digestão foram realizadas a 37°C por 16 horas contendo 300 ng de gDNA para 1 unidade enzima em reações separadas. Após o término das digestões as enzimas foram inativadas por 20 minutos a 65°C e armazenadas a -20 °C. Como controle das reações, o gDNA foi incubado juntamente com as digestões das enzimas *HpaII* e *MspI*, mas somente com o tampão da reação enzimática. Para determinação da porcentagem de metilação global, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0.8% contendo *Gel Red*. O valor da porcentagem de metilação global das amostras foi determinado pela divisão do resultado obtido pela multiplicação por 100 do resultado da diferença da intensidade da banda referente a digestão do gDNA pela enzima *HpaII* (sensível à metilação) pela intensidade da banda referente à digestão da enzima *MspI* (não sensível à metilação) pelo valor obtido da intensidade da banda referente ao gDNA intacto (não digerido) [(DNA digerido pela *HpaII* - DNA digerido pela *MspI*)x100/ gDNA intacto)] (MOLOGNONI et al, 2011). Os valores referentes as intensidades das bandas foram obtidos através de análises densitométrica utilizando-se o software *Scion Image*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e experimento foi realizado em quadruplicata. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o grupo dos pesquisadores da Profa. Dra. Ana Paula de

Souza Pardo e Rodrigo Augusto da Silva do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

#### **4.9 Determinação de proteínas**

O conteúdo de proteínas das diferentes preparações foi determinado de acordo com o método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina bovina sérica como padrão.

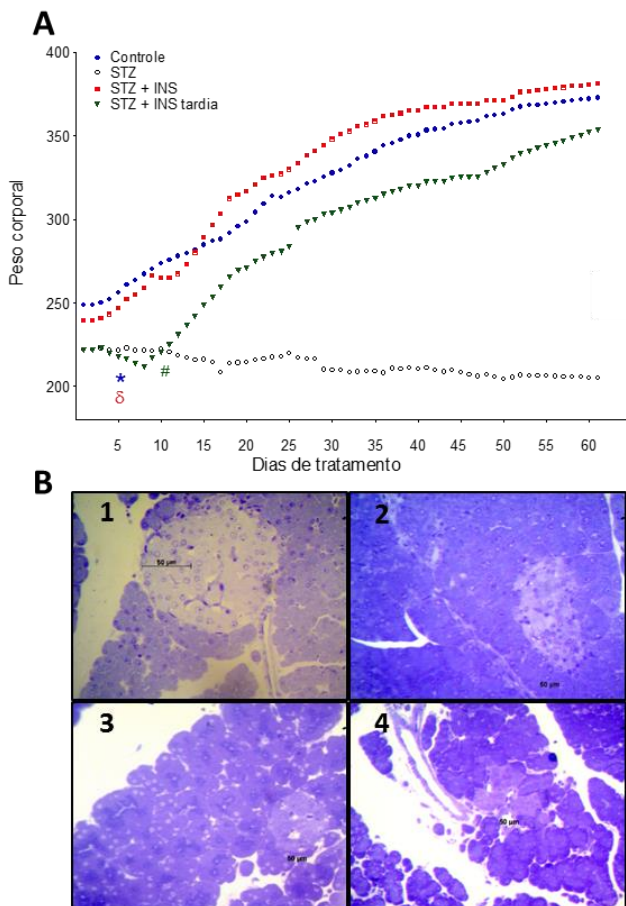
#### **4.10 Análise estatística**

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados dos pesos dos animais foram analisados utilizando o teste ANOVA de uma via com modelo linear quando o valor de  $F$  foi significativo. Os resultados das determinações bioquímicas foram analisados usando ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey. Somente os valores significantes de  $F$  são mostrados no texto. A diferença entre grupos foi considerada significativa quando  $P \leq 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram feitas através do programa SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences). Todos os gráficos foram gerados usando GraphPad Prism 5®.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre a massa corporal e arquitetura das ilhotas de Langerhans em ratos Wistar adultos

A Figura 5A mostra as alterações na massa corporal induzida pela administração de STZ e o efeito da administração de insulina exógena nesta medida, em ratos Wistar adultos. Pode-se observar na figura que a administração de STZ nos animais causou uma redução significativa no ganho de peso corporal (iniciando a partir do dia 7 com 7,4% de redução e chegando a 70% no final do tratamento) quando comparado ao grupo controle. A figura também mostra que o tratamento com insulina preveniu a perda de massa induzida pela STZ, sendo estes valores semelhantes aos apresentados pelos animais do grupo controle (veículo). Ainda, pode-se observar que os animais do grupo STZ + INS tardia não apresentaram ganho de peso nos primeiros 10 dias após a administração de STZ e, logo após o início da terapia de reposição com insulina, estes apresentaram aumento da massa corporal com diferença significativa após 12 dias quando comparados ao grupo de animais hiperglicêmicos (grupo STZ) [ $F_{(3,147)}=224,7$ ;  $P < 0,0001$ ]. A Figura 5B mostra a arquitetura das ilhotas de Langerhans em cortes semifinos de ratos Wistar submetidos ao protocolo de hiperglicemia. Pode se observar uma diminuição no tamanho e alteração da arquitetura das ilhotas de Langerhans em todos os grupos tratados com STZ.



**Figura 5.** Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin®N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a massa corporal (A), e morfologia das ilhotas de Langerhans (B) de ratos Wistar machos adultos. Os dados estão representados como média do peso (7 a 11 animais por grupo). O peso corporal foi significativamente diferente entre os grupos controle e STZ no dia 7 (\*), entre STZ e STZ + INS no dia 7 (δ) e entre STZ e STZ + INS Tardia no dia 12 (#) (ANOVA de uma via com modelo linear). A morfologia das ilhotas de Langerhans foi obtida a partir de cortes semifinos de pâncreas corados com azul de toluidina e observados em microscópio óptico em uma magnificação de 400X. B1: Controle; B2: STZ; B3: STZ + INS e B4: STZ + INS tardia.

## **5.2 Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre a glicemia, perfil lipídico plasmático, insulinemia e HOMA-IR em ratos Wistar adultos**

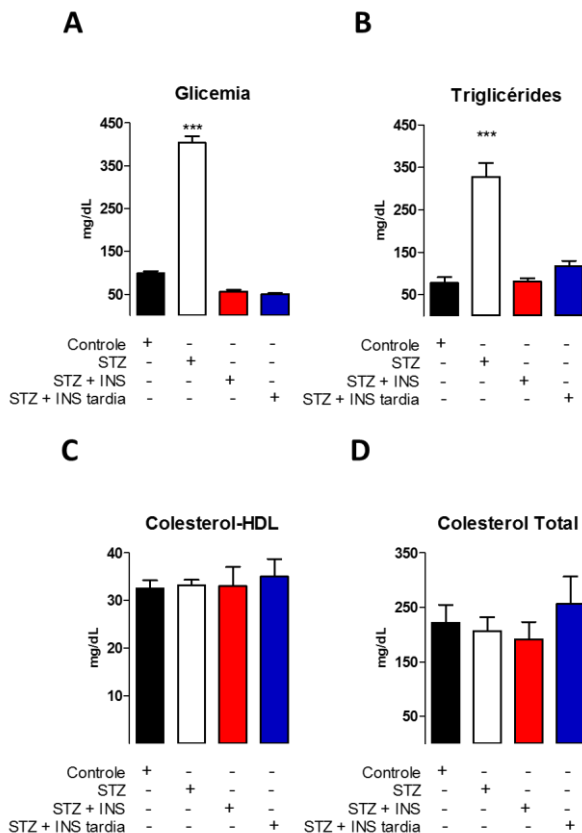
A Figura 6A mostra os valores de glicemia dos animais dos diferentes grupos experimentais após 60 dias de tratamento. Pode ser observado na figura um aumento significativo na glicemia nos animais do grupo STZ, que foi prevenido significativamente pela administração de insulina, nos animais dos grupos STZ + INS e STZ + INS tardia [ $F_{(3,25)}=28,02$ ;  $P < 0,001$ ]. Resultados prévios desta pesquisa demonstraram resultados similares após 10, 30 ou 45 dias de tratamento (Remor et al., 2011).

As Figuras 6B a D mostram o perfil lipídico sanguíneo dos animais submetidos aos diferentes tratamentos experimentais. Pode ser observado na Figura 6B que a hiperglicemia crônica (animais do grupo STZ) provocou aumento significativo nas concentrações de triglicerídeos (aumento de 322%) após 60 dias de tratamento, e que essa alteração foi prevenida pela administração de insulina (animais dos grupos STZ + INS e STZ + INS tardia) [ $F_{(3,14)}=40,59$ ;  $P < 0,001$ ]. Em contrapartida, as Figuras 6C e 6D mostram que estes tratamentos não alteraram as concentrações de colesterol total e colesterol contidos nas partículas HDL.

A Figura 7 mostra o efeito da administração de STZ e de insulina exógena, sobre as concentrações plasmáticas de insulina e sobre índice HOMA-IR em ratos Wistar adultos. Pode ser observado na Figura 7A uma depleção quase total nas concentrações da insulina nos animais do grupo STZ, enquanto que os ratos que receberam insulina mostram valores significativamente maiores do que os controles (aumento de 1322% nos animais do grupo STZ + INS, e de 1670% nos animais do grupo STZ + INS tardia). Ainda podem ser observadas nesta figura, diferenças significativas entre a insulinemia dos dois grupos de animais que receberam insulina [ $F_{(3,10)}=10,65$ ;  $P < 0,001$ ]. A Figura 7B mostra um perfil similar à insulinemia no cálculo do índice HOMA-IR. Nos animais que receberam altas doses de insulina com o intuito de manter o estrito controle da normoglicemia, pode ser observado um aumento significativo no índice HOMA-IR [ $F_{(3,12)}=10,90$ ;  $P < 0,01$ ].

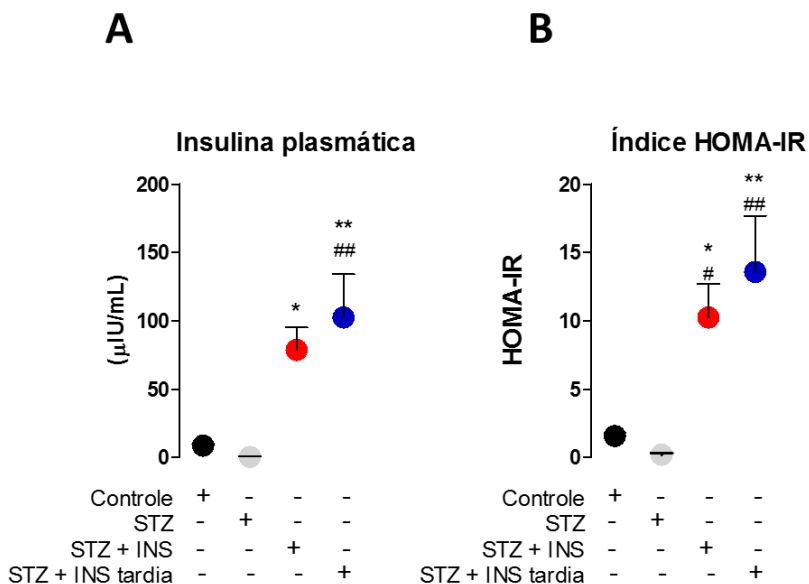
Neste trabalho também foram investigadas as concentrações de insulina cerebrais. No entanto, as baixas concentrações do hormônio não

foram detectadas pelo método empregado, o qual apresenta uma sensibilidade de 0,8 – 3 000  $\mu\text{UI/mL}$  (26,6 – 100.000 pg/mL).



**Figura 6.** Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup>N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre o perfil metabólico de ratos Wistar machos adultos. A glicemia foi controlada pela administração imediata (STZ + INS) ou tardia de insulina (STZ + INS tardia) (insulina Novolin<sup>®</sup>N; 1.5 UI a cada 12h). As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média de 4 a 6 experimentos independentes (animais). \*\*\*  $P < 0,001$  vs. controles (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

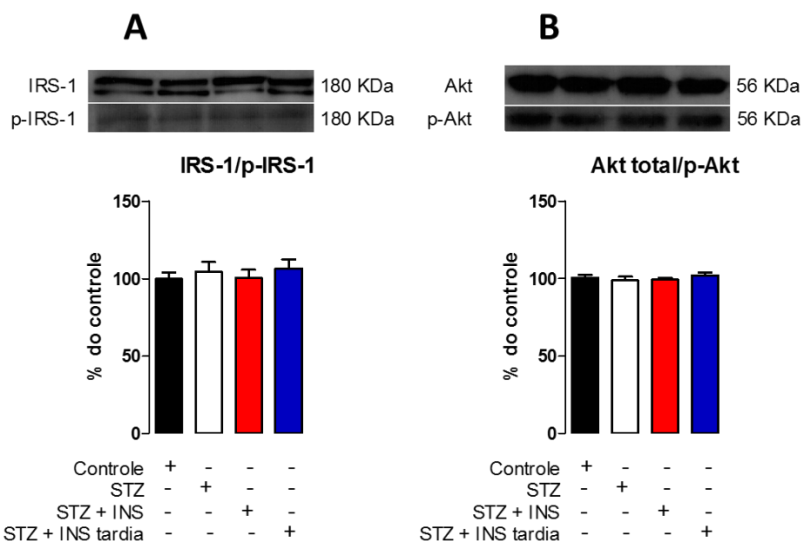




**Figura 7.** Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup>N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a insulinemia (A) e a resistência sistêmica à insulina (B) em ratos Wistar machos adultos. A determinação da concentrações de insulina foi realizada por kit comercial (AlphaLISA Insulin Kit – Perkin Elmer). A resistência sistêmica à insulina foi calculado mediante o índice HOMA-IS (*Homeostatic model assessment*; HOMA-IR). As barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média de 4 a 6 experimentos independentes (animais). \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ , vs. controles; #  $P < 0,05$ ; ##  $P < 0,01$  vs. STZ (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

### 5.3 Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre a sinalização mediada pela insulina em córtex cerebral de ratos Wistar adultos

A Figura 8 mostra o efeito da hiperglicemia crônica e da administração de insulina sobre a relação do conteúdo de proteína total vs. proteína fosforilada do substrato do receptor de insulina (IRS-1) e de Akt em córtex cerebral de ratos Wistar. Pode ser observado nas Figuras 8A e B que o conteúdo destas proteínas (total e fosforilada) não foi alterado nas estruturas cerebrais estudadas.



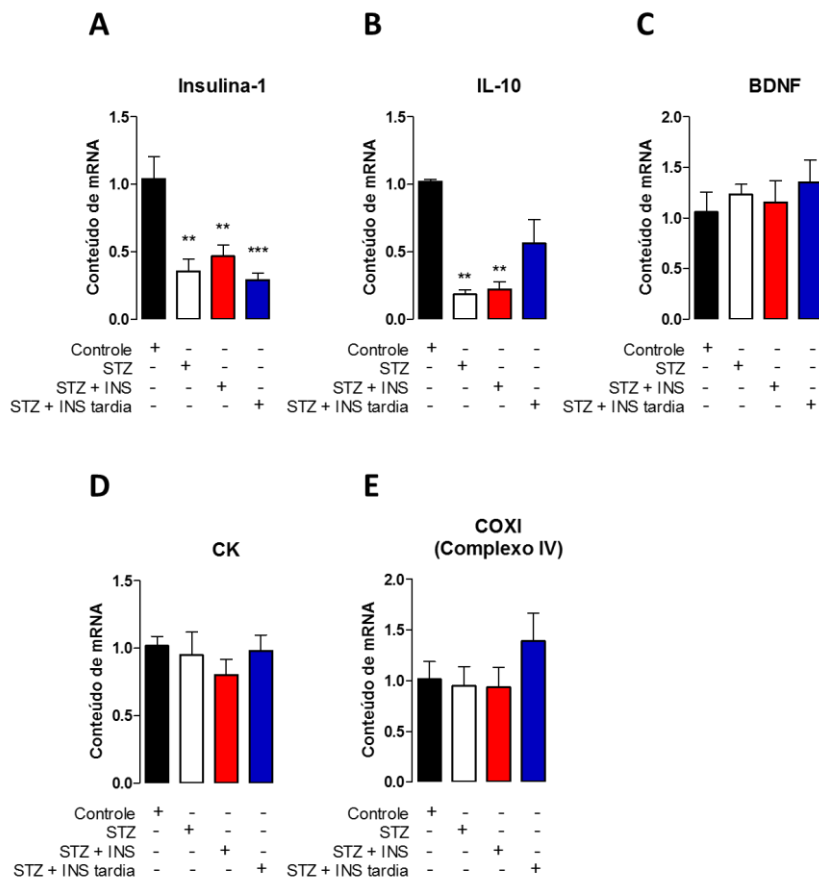
**Figura 8.** Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup>N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a relação do conteúdo das proteínas substrato do receptor de insulina (IRS-1; A) e Akt (B), nas formas total e fosforiladas. As barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média de 4 experimentos independentes (animais) (ANOVA de uma via).

#### **5.4 Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre a expressão dos genes que codificam para insulina-1, CK, IL-10, BDNF e de proteínas envolvidas na cadeia respiratória em hipocampo de ratos Wistar adultos**

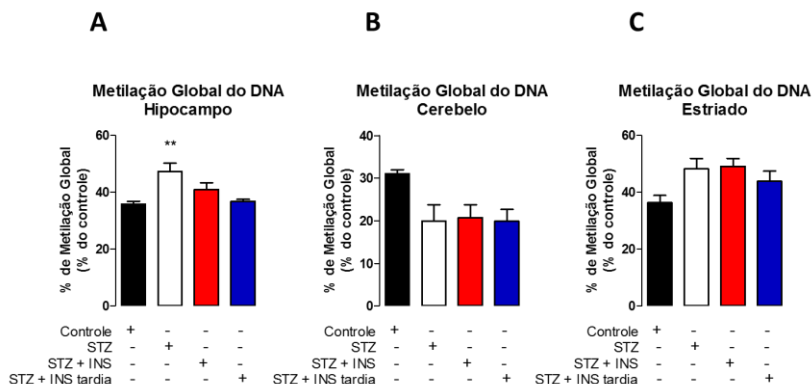
A Figura 9 mostra o efeito da hiperglicemia crônica e da terapia com insulina na expressão dos genes que codificam para as proteínas de insulina-1 (A), IL-10 (B), BDNF (C), CK (D), e COXI (subunidade I da citocromo *c* oxidase do complexo IV da cadeia respiratória codificado pelo DNA mitocondrial; E) em hipocampo de ratos Wistar adultos. A Figura 9A mostra uma redução significativa na expressão do gene da insulina-1 no hipocampo de ratos hiperglicêmicos (STZ; 66%, de diminuição). Um efeito similar foi observado nos grupos que receberam terapia com insulina exógena precoce (STZ + INS; 55% de redução) e tardia (STZ + INS tardia; 72% de redução) [ $F_{(3,12)}=11,93$ ;  $P < 0,001$ ]. A Figura 9B mostra também uma redução significativa no conteúdo do mRNA de IL-10 em animais dos grupos experimentais STZ e STZ + INS (diminuição de 82% e 96%, respectivamente) [ $F_{(3,9)}=8,21$ ;  $P < 0,001$ ]. As Figuras 9C-E mostram os diversos tratamentos experimentais não alteraram a expressão dos genes que codificam para BDNF, CK, e COXI (complexo IV).

#### **5.5 Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre o perfil de metilação global do DNA em hipocampo, cerebelo e estriado de ratos Wistar adultos**

A Figura 10 mostra o efeito da hiperglicemia crônica e da administração de insulina sobre a metilação global do DNA em estruturas cerebrais de ratos Wistar adultos. Pode ser observado na figura que a hiperglicemia crônica provocou um aumento significativo do perfil de metilação global no DNA (aumento de 32%) exclusivamente em hipocampo de ratos Wistar hiperglicêmicos, e que esta alteração foi prevenida pela administração de insulina exógena [ $F_{(3,9)}= 8,00$ ;  $P < 0,001$ ].



**Figura 9.** Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup>N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a expressão relativa dos genes que codificam para as proteínas insulina-1 (A), IL-10 (B), BDNF (C), CK (D) e COXI (subunidade do complexo IV da cadeia respiratória; (E) em hipocampo de ratos Wistar. Os resultados foram normalizados mediante a quantificação da expressão do gene que codifica para  $\beta$ -actina. As barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média de 4 a 5 experimentos independentes (animais) (ANOVA de uma via). \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. controles (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).



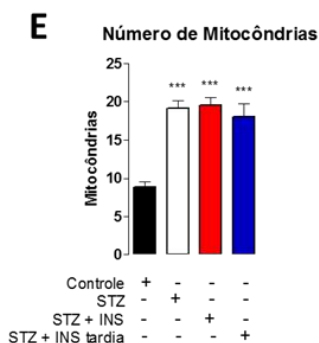
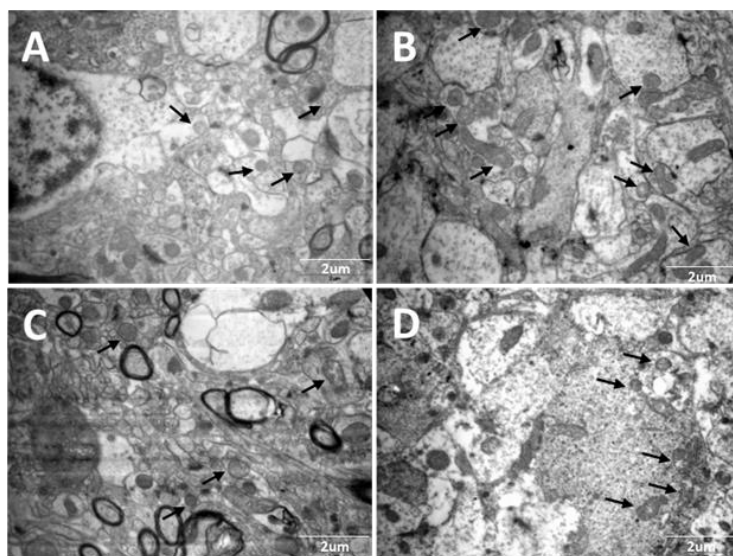
**Figura 10.** Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup>N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a metilação global do DNA em hipocampo (A), cerebelo (B) e estriado (C) de ratos Wistar machos adultos. As barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média do porcentagem de metilação global em relação aos controles de 4 experimentos independentes (animais). \*\*  $P < 0,01$  vs. controles (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

## 5.6 RESULTADOS PRELIMINARES

### **5.6.1 Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e o efeito da insulina (INS) exógena sobre o conteúdo mitocondrial em bulbo olfatório de ratos Wistar adultos**

O seguinte grupo de dados corresponde a resultados preliminares obtidos durante o desenvolvimento do Mestrado Sanduíche na *Universidad Nacional de Córdoba*, Córdoba, Argentina, durante o período de 04 de setembro de 2011 a 03 de dezembro de 2011 sob a coordenação da professora Ana Lucia De Paul. Este estágio internacional foi financiado pelo Programa de Centros Associados para o Fortalecimento das Pós-Graduações Brasil / Argentina (CAFP/BA, CAPES/SPU 001/2008).

A Figura 11 mostra o efeito da administração de STZ e de insulina exógena, sobre o conteúdo mitocondrial em bulbo respiratório. Pode ser observado nas Figuras 11A-E um aumento de 117% no número de mitocôndrias no bulbo de ratos hiperglicêmicos (STZ), bem como, nos animais receberam terapia com insulina exógena (STZ + INS; 122% de aumento e STZ + INS tardia; 105% de aumento) [ $F_{(3,36)}=18,42$ ;  $P < 0,0001$ ].



**Figura 11.** Efeito *in vivo* da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup>N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea) sobre o conteúdo mitocondrial em bulbo olfatório de ratos Wistar. As fotografias 11A-D são representativas da análise realizada por microscopia eletrônica de transmissão. A magnificação das fotografias corresponde a 10.000x. A contagem de mitocôndrias foi realizada em campos aleatórios e a média de mitocôndrias/campo foi calculada, empregando o software ImageJ<sup>®</sup>. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3 experimentos independentes). \*\*\*  $P < 0,001$ ; comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey). A: Controle; B: STZ; C: STZ + INS e D: STZ + INS tardia.

## 6 DISCUSSÃO

O DM é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla caracterizada pela persistente hiperglicemia decorrente da falta de insulina e/ou da resistência dos tecidos à ação do hormônio ((HAN et al., 2007; MALECKI e SKUPIEN, 2008). As complicações do DM estão caracterizadas por microvasculopatias que incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia central e periférica, e complicações macrovasculares caracterizadas por doença coronária, doença vascular periférica, infarto em tecidos periféricos e no SNC, e amputações dos membros inferiores, que representam a principal causa de óbito nos afetados. A natureza crônica, a gravidade das suas complicações e o número de indivíduos acometidos (10 milhões de diabéticos no Brasil e 300 milhões de diabéticos no mundo), tem tornado o DM um problema de saúde pública que onera os afetados e suas famílias, e também o sistema público de saúde (ADA, 2012).

A descoberta que a insulina sintetizada no pâncreas tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e promover diferentes eventos tróficos no SNC, mudou a visão dos pesquisadores das áreas básicas e das aplicadas, no que se refere ao conceito de resistência tecidual ao hormônio insulina. Nestes últimos anos, tem sido demonstrado que falhas na sinalização insulínica estão associadas com o risco de desenvolver demência e/ou alterações cognitivas (HILDRETH et al., 2012; OHARA et al., 2011; YAFFE et al., 2004). Esta predisposição estaria diretamente envolvida com a redução dos efeitos benéficos da insulina no SNC, que fisiologicamente promoveriam o crescimento e sobrevivência neuronal, expressão de numerosos genes, metabolismo, síntese de proteínas, formação da sinapse e plasticidade neuronal (D'ERCOLE et al., 1996; JELLINGER, 2006; MARTIN et al., 2012). A forma mais comum de demência nos pacientes com resistência tecidual à insulina e/ou DM, corresponde à doença de Alzheimer (RITCHIE e LOVESTONE, 2002). Ainda, estudos recentes relatam que a administração de insulina no SNC aumenta a performance cognitiva em modelos animais que mimetizam a doença de Alzheimer (DE FELICE et al., 2009; WATSON et al., 2005). Enquanto que outros mostraram que animais submetidos a uma dieta hipercalórica para induzir resistência à insulina, promove o acúmulo de peptídeo  $\beta$  amiloide e da formação de emaranhados neurofibrilares no SNC, os que correspondem aos achados neuropatológicos característicos desta doença neurodegenerativa (ASHE,



2000). Baseado neste e outros dados, a doença de Alzheimer tem sido classificada como DM 3 devido principalmente aos mecanismos patológicos da doença corresponder com o estado de resistência crônica à insulina no cérebro (DE LA MONTE e WANDS, 2008).

Embora pesquisadores do Brasil e do mundo tenham contribuído significativamente para o entendimento da sinalização da insulina no SNC (D'ERCOLE et al., 1996; DE FELICE et al., 2009; JELLINGER, 2006; MARTIN et al., 2012), estudos relacionados com a produção de insulina neste órgão ainda são escassos. Possivelmente, a baixa concentração de insulina cerebral, a qual tem sido estimada em 10 ng/g tecido (HAVRANKOVA et al., 1979), tenha sido um fator limitante neste tipo de estudos. No entanto, outras medidas como a expressão do gene que codifica para insulina, ou a identificação do hormônio por microscopia eletrônica de transmissão acoplada a anticorpos associados a partículas de ouro, tem sido mais frequentemente reportados (MACHIDA et al., 2012; SCHECHTER et al., 1999; SCHECHTER et al., 1994; SCHECHTER et al., 1998; STRATHDEE et al., 1996; ZHAO et al., 1999).

Por outro lado, o impacto da hiperglicemia crônica sobre o SNC também não está bem definido, embora se saiba que existe uma relação estreita entre doenças metabólicas crônicas, como do DM, e disfunção mitocondrial (FISKUM et al., 1999; MANFREDI e BEAL, 2000; MURPHY et al., 1999; NICHOLLS e BUDD, 2000). Sabe-se que as células neurais têm uma alta demanda metabólica e um grande requerimento de energia, desta forma, muito vulneráveis às alterações que envolvem disfunções na fisiologia desta organela. Esta grande demanda energética deve-se ao fato que os neurônios são células altamente diferenciadas que necessitam grandes quantidades de ATP para a correta manutenção dos gradientes iônicos transmembrana e para os processos de neurotransmissão (SILVER e ERECINSKA, 1998). Desta forma, o funcionamento adequado do SNC requer o suprimento contínuo de glicose desde a circulação periférica (ERECINSKA et al., 1994) e, devido ao fato que os transportadores de glicose das células neurais não dependem de insulina para a captação de glicose, o conteúdo de glicose intracelular é um reflexo das concentrações de glicose sanguínea. A persistência de altas concentrações de glicose no interior das células neurais, como observado na hiperglicemia que caracteriza o DM (até quatro vezes o valor basal), leva a uma condição que foi definida como neurotoxicidade da glicose (TOMLINSON e GARDINER, 2008). Esta

glicotoxicidade seria responsável por induzir uma série de mecanismos deletérios que incluem aumento da via metabólica dos polióis, glicação não enzimática de proteínas, ativação da proteína cinase C e aumento no metabolismo das hexosaminas, e provocando modificações no metabolismo celular. Tem sido descrito que estas alterações metabólicas culminam com a produção de espécies reativas, oxidação de proteínas, inativação de enzimas citosólicas e mitocondriais, alterações no sistema de defesa antioxidante, entre outros (BROWNLEE, 2001; FOLMER et al., 2002; MUKHERJEE et al., 1998; ROSEN et al., 2001). Ainda, a glicotoxicidade também poderia ser responsável pela indução de memória metabólica, situação em que se estas condições de hiperglicemia não forem rapidamente controladas (controle glicêmico) os mecanismos de toxicidade induzidos não poderão mais ser revertidos (CERIELLO et al., 2009; IHNAT et al., 2006; NATHAN et al., 2005).

Neste cenário, o presente trabalho focou em dois pontos principais: por um lado nos mecanismos moleculares que são desencadeados no SNC na ausência de insulina pancreática (animais STZ) e o efeito da insulina exógena sobre estes, o que permitiu contribuir com uma melhor caracterização deste modelo empregado por pesquisadores de todo o mundo; por outro lado, também se focalizou no estudo dos mecanismos que poderiam estar envolvidos no fenômeno de memória metabólica.

## **6.1 Novas contribuições e características do modelo de hiperglicemia induzido pela administração de STZ**

### *6.1.1 Massa corporal e arquitetura do pâncreas endócrino*

Os modelos de diabetes experimental em animais de laboratório têm sido amplamente utilizados para simular o DM da população. O modelo de DM mais empregado é gerado através da administração de STZ que provoca lesões irreversíveis nas células  $\beta$  pancreáticas, as quais deixam de produzir a insulina, tornando o animal hiperglicêmico (ELLIOTT et al., 1997). Numerosos trabalhos tem demonstrado que prejuízo na função das células  $\beta$  levam à deterioração do transporte da glicose e do seu metabolismo e, desta forma, diminuindo a expressão de genes e síntese de proteínas (NUKATSUKA et al., 1990; STRANDELL et al., 1988; WANG et al., 2002). Os resultados desta pesquisa estão de acordo com estas pesquisas prévias, corroborando que a falta de insulina compromete a síntese proteica, a qual foi evidenciada pela redução

significativa da massa corporal. Este efeito foi revertido pela reposição do hormônio após alguns dias de terapia (7 dias nos animais do grupo de STZ + INS e 12 dias nos animais do grupo STZ + INS tardia). Sabe-se que a insulina promove a fosforilação do complexo mTOR através da via da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), que está envolvida diretamente nos efeitos anabólicos deste hormônio, estimulando dessa forma a síntese de proteínas para a constituição corporal (GARCIA-CAO et al., 2012; MORGENSZTERN e MCLEOD, 2005). Ainda observou-se uma marcada alteração da arquitetura do pâncreas endócrino, caracterizada por uma massiva redução das ilhotas de Langerhans. Convenientemente, a reposição de insulina, não estimulou nem a proliferação nem a funcionalidade das células  $\beta$ , tornando assim o efeito da administração de STZ irreversível. Isto é um achado interessante, no que se refere à utilização deste modelo por longos períodos de tempo, haja vista que outros modelos animais de DM, normalmente empregados na pesquisa, usam compostos como aloxana. No entanto, o efeito desta sobre a indução de hiperglicemia é revertido após poucas semanas (HADOUR et al., 1998). Para isso, o retorno a normoglicemia tem sido proposto como uma consequência da multiplicação das células  $\beta$  que sobreviveram ao dano causado pela aloxana, ou também pela formação de novas células  $\beta$  a partir do epitélio da porção exócrina do pâncreas (BENCOSME, 1955; WANG et al., 2010).

### 6.1.2 *Perfil lipídico*

Sabe-se que a hiperglicemia constante resulta em síndrome metabólica. Bioquimicamente, esta condição é caracterizada por hiperglicemia e dislipidemia (WHO, 1998). Neste trabalho observou-se que ambas alterações metabólicas, sendo a dislipidemia caracterizada por hipertrigliceridemia, foram revertidas pela administração de insulina, e mantidas ao longo do tratamento dentro de valores similares aos dos animais controles (1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea). Desta forma, deve ser salientado que este modelo além de gerar glicotoxicidade também gera lipotoxicidade, como previamente apontado por Poitout (2002). Sabe-se que a exposição prolongada a ácidos graxos resulta no acúmulo de citrato no citosol, um precursor da malonil CoA, e como consequência, inibe a enzima carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), responsável pelo transporte de ácidos graxos para dentro da mitocôndria. A inibição prolongada da CPT1 resulta no acúmulo citosólico de ácidos

graxos de cadeia longa, e estes seriam os responsáveis pela lipotoxicidade celular (POITOUT et al., 2002).

Por outro lado, sabe-se que o aumento persistente de triglicerídeos nos pacientes com DM está associado com o alto risco destes em desenvolver doenças cardiovasculares e acidentes vasculares cerebrais (Abstracts of the 6th International Congress of the Immunology of Diabetes Society and American Diabetes Association Research Symposium. October 3-6, 2002, Copper Mountain, Colorado, USA, 2002; KILPATRICK et al., 2007; SIBLEY et al., 2003). De acordo com isto, a manutenção das concentrações ideais de lipídios constitui um dos objetivos do tratamento dos pacientes diabéticos, pois a dislipidemia observada no DM, juntamente com a hiperglicemia, é diretamente responsável pelas complicações macrovasculares observadas na doença, como o desenvolvimento de aterosclerose e doença coronariana (FERRANNINI et al., 1992; RENARD et al., 2004).

### *6.1.3 Produção de insulina na periferia e no SNC*

A desorganização na arquitetura das ilhotas de Langerhans induzida pela administração de STZ correspondeu, como esperado, com falhas na produção de insulina, fato responsável pelas alterações bioquímicas acima apresentadas. Neste trabalho o comprometimento das células  $\alpha$ ,  $\delta$  ou PP não foi analisado, mas trabalhos prévios demonstram que a produção de glucagon não é modificada, enquanto que a de somatostatina, é reduzida em torno de 50% pelo tratamento com STZ (GOTO et al., 1981; KADOWAKI et al., 1980).

Aqui observa-se que a reposição insulínica preveniu significativamente as modificações no perfil lipídico plasmático e na glicemia geradas pela administração de STZ. No entanto, as doses de insulina que permitiram este controle metabólico geraram outra situação, que podemos definir de mista, e que foi caracterizada por normoglicemia, normolipidemia e hiperinsulinemia. Assim, pode-se sugerir que nestas condições experimentais, este modelo pode ser empregado para entender o efeito de altas concentrações de insulina na periferia, sem alteração nos parâmetros bioquímicos que caracterizariam a síndrome metabólica. Ainda, o cálculo do índice HOMA-IR se correlacionou diretamente com as concentrações de insulina, haja vista que as glicemias encontraram-se durante todo o tratamento dentro da normalidade (estes dados foram

previamente publicados pelo grupo de pesquisa em Remor, Matos et al. (REMOR et al., 2011).

Sabe-se que a ausência do hormônio leva a redução no conteúdo das proteínas IRS-1, IRS-2 nas formas fosforiladas, bem como prejuízo na atividade da Akt em tecidos periféricos como coração, células endoteliais, músculo esquelético, fígado e rim, mostrando dessa forma compromisso na sinalização celular mediada por insulina (CHUN et al., 2011; HUISAMEN et al., 2012; LAVIOLA et al., 2001; NEMOTO et al., 2011; ZHENG et al., 2011). A determinação das concentrações plasmáticas do hormônio dos animais em jejum após 60 dias de tratamento, demonstrou valores muito próximos de zero. Assim, deve ser considerado em todos os estudos deste trabalho, realizados no SNC, que a contribuição da insulina periférica (pancreática) foi nula. Embora não foi possível a mensuração do hormônio no SNC, pode-se inferir que o uso de STZ não comprometeu a síntese central de insulina. Isto está de acordo com Havrankova et al. (1979), que demonstraram que a insulina no SNC aumenta de duas a cinco vezes o valor encontrado em animais normoglicêmicos, após 10 e 30 dias, da administração de STZ, respectivamente. Ainda, como previamente apontado por Devaskar e colaboradores (1994) e Schechter e colaboradores (1996), esse aumento corresponderia à síntese *de novo* do hormônio, sendo que o córtex cerebral corresponderia a uma das regiões onde a insulina se apresenta em maiores concentrações (HAVRANKOVA et al., 1978; BASKIN et al., 1987; UNGER et al., 1991). De acordo com isto, pode ser entendido que não tenham sido observadas alterações no conteúdo proteico de IRS-1 e Akt, alvos celulares clássicos da insulina, bem como na sua fosforilação, no córtex cerebral dos animais que receberam STZ. Por outro lado, apesar da terapia com insulina ter normalizado as concentrações plasmáticas de glicose, e ainda ter provocado hiperinsulinemia, a sinalização mediada pelo receptor da insulina no córtex cerebral também não foi comprometida. Isto pode estar relacionado com a saturação das proteínas da barreira hematoencefálica (BHE), responsáveis pelo transporte da insulina desde a periferia ao SNC (JAGUA et al., 2008; VAN DER HEIDE et al., 2006). Ainda, a menor expressão do gene que codifica para a insulina observada neste estudo no hipocampo dos animais que receberam STZ, também estaria de acordo com uma maior síntese central de insulina. Uma maior produção endógena hipocampal provocaria a modulação negativa da expressão do seu próprio gene, como foi

demonstrado previamente por outros pesquisadores (GRUNBLATT et al., 2007).

Em contraste com o que ocorre na maioria dos tecidos periféricos, a captação de glicose pelo SNC é independente de insulina. Entretanto, a presença de receptores de insulina no cérebro leva a reconhecer a importância deste hormônio e sua sinalização em funções não metabólicas, como a sobrevivência neuronal, plasticidade dendrítica e sináptica, além da participação na consolidação do aprendizado e memória (CHIU et al., 2008; VALENCIANO et al., 2006; WAN et al., 1997; ZHAO et al., 1999).

#### *6.1.4 Efeitos desencadeados no SNC pela ausência de insulina pancreática e o papel da insulina exógena*

Apesar da sinalização de insulina não estar comprometida no córtex cerebral de animais diabéticos, sabe-se que a hiperglicemia está diretamente relacionada com alterações na expressão gênica, como por exemplo, de genes relacionados à inflamação (IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10) e genes responsivos a glicose (insulina-1 e insulina-2) (DEERING et al., 2009; LING e GROOP, 2009). Desta forma, investigou-se neste trabalho a expressão gênica de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Foi observada uma diminuição na expressão deste gene em hipocampo de ratos hiperglicêmicos e ratos hiperglicêmicos tratados com insulina. Esta diminuição também foi observada por demais autores, em sangue de ratos hiperglicêmicos e cultura de células da micróglia de humanos (HADISAPUTRO et al., 2012; PHAM et al., 2011; SHENG et al., 1995; VAN EXEL et al., 2002). O resultado encontrado neste trabalho pode ser devido ao aumento da via das hexosaminas que ocorre em condições de hiperglicemia. O produto final desta via é o intermediário UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) que pode reagir com várias proteínas, como o fator de transcrição nuclear Sp1, o qual regula a transcrição do gene da IL-10 (BRIGHTBILL et al., 2000; MCCARREN, 2003). A interação de UDP-GlcNAc com Sp1 diminui sua atividade (FRICOVSKY et al., 2012), levando à diminuição do conteúdo de RNAm da IL-10.

No que se refere à expressão do gene que codifica para o BDNF, os resultados mostram que nenhum dos tratamentos modulou o conteúdo de mRNA no hipocampo destes animais. O BDNF é uma neurotrofina responsável pela estimulação do processo de regeneração neural em diversas áreas cerebrais, agindo como mediador da eficácia sináptica,

aumentado a conectividade entre os neurônios e favorecendo, portanto, a neuroplasticidade (COTMAN e BERCHTOLD, 2002). No entanto, estes resultados não necessariamente sugerem que a homeostase do SNC não seja comprometida durante o estado hiperglicemia crônica. O BDNF é sintetizado primeiramente na forma precursora pró-BDNF, que subsequentemente é clivada tanto intracelular, pelas pró-hormonioconvertases e/ou furinas, quanto extracelularmente através das plasminas e metaloproteases, para gerar a forma madura do BDNF que age sobre os receptores Trk (MOWLA et al., 1999; SEIDAH e CHRETIEN, 1999). A forma pró-BDNF é conhecida por ligar-se ao receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), o qual está localizado nos axônios e na região pré-sináptica (DOUGHERTY e MILNER, 1999), assim como, nas espinhas dendríticas na região CA1 do hipocampo (WOO et al., 2005). A ativação do p75NTR tem sido implicada na apoptose, prejuízo no alongamento axonal e transmissão sináptica (DECHANT e BARDE, 2002). Foi proposto que o p75NTR, via pro-BDNF, pode prejudicar também a plasticidade sináptica, facilitando a depressão de longa duração ao invés de potenciação de longa duração (WOO et al., 2005). Sendo assim, ambas as formas do BDNF tem funções distintas e opostas na regulação da morte e sobrevivência celular (TENG et al., 2005). Consequentemente, a clivagem do pro-BDNF é um passo crucial na neuroplasticidade e, um eventual desequilíbrio nesse processo levaria a uma inibição no crescimento neuronal e redução na densidade dendrítica no hipocampo como previamente descrito em modelos de DM e doença de Alzheimer (DE FELICE et al., 2009; WATSON et al., 2005). Além disso, foi demonstrado que a redução no conteúdo da forma madura de BDNF provoca um aumento na ingestão de alimento e da massa corporal, efeitos opostos aos aqui encontrados (HAYES et al., 1997; KERNIE et al., 2000; ONO et al., 1997; SHA et al., 2007; XU et al., 2003). Ainda a redução no BDNF pode participar no desenvolvimento de resistência a insulina, caracterizado por aumento nas concentrações de glicose, insulina e leptina (KAHN et al., 2006; SHA et al., 2007). Desta forma, estudos adicionais de conteúdo da forma madura do BDNF são necessários, visto que a redução da expressão gênica de IL-10 somado a uma redução na clivagem do BDNF poderia predispor a alterações cognitivas (SIGWALT et al., 2011), e estar envolvido nos mecanismos que levam a DM3.

A redução hipocampal na expressão desta proteína tem sido previamente demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa num modelo de

depressão induzido por hipercortisolemia crônica (SIGWALT et al., 2011). Portanto, a redução desta poderia predispor a alterações cognitivas e estar envolvido nos mecanismos que levam a DM3.

Como descrito anteriormente, a glicose é um dos principais fatores que podem regular genes que modulam o metabolismo energético (BURKE et al., 2009). Neste contexto, analisou-se a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo energético, como COXI (subunidade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial) e creatina cinase (CK). Estas proteínas foram escolhidas porque em trabalhos realizados por pós-graduandos do nosso grupo foi observado que a atividade da COXI encontra-se reduzida, a da CK aumentada, e a expressão dos genes destas inalterados no córtex cerebral de ratos submetidos aos mesmos tratamentos experimentais aqui utilizados (REMOR, GLASER, MATOS, et al. Comunicação pessoal). Considerando que a expressão dos genes codificantes de ambas as proteínas não foi modificada pelos tratamentos, pode-se concluir que as modificações observadas nas atividades enzimáticas não são devido a modulações na expressão gênica. Dentre os eventos que podem estar relacionados a estas alterações enzimáticas, podemos citar a interação direta do metilglicoxal ou de proteínas oxidadas que são formadas durante condições de hiperglicemia crônica, com estas enzimas alterando de alguma forma sua função, ou indiretamente pela geração de estresse oxidativo o qual é gerado tanto sistêmica quando no SCN neste modelo animal de DM (RAFEHI et al., 2012; REMOR et al., 2011).

As readaptações no metabolismo energético cerebral observadas pelo nosso grupo de pesquisa em animais em estado crônico de hiperglicemia foram aqui corroboradas por um aumento no conteúdo mitocondrial. Embora estes resultados sejam preliminares, e um número maior de amostras ainda deva ser analisado em bulbo e em outras estruturas cerebrais, estes dados concordam também com resultados prévios do nosso grupo e de outros pesquisadores, que mostram aumento no número de mitocôndrias de morfologia esferoidal e aumento na expressão de Tfam (fator A de transcrição mitocondrial) (TWIG et al., 2008). Este resultado pode ser justificado devido ao fato de a interação da insulina com seus receptores específicos provocar a ativação da via da PI3K, promovendo a ativação de AKT, que por sua vez fosforila NRF1 (fator de transcrição que controla, entre outros processos, o número de mitocôndrias), aumentando a transcrição de Tfam (BIJUR e JOPE, 2003; YANG et al., 2012). Além disso o aumento da biogênese mitocondrial no



grupo hiperglicêmico pode ser devido a um mecanismo compensatório decorrente da glicotoxicidade hiperglicêmica. Estudos realizados por Kukidome e colaboradores (2006) em neurônios e células endoteliais demonstraram que o aumento da biogênese mitocondrial decorrente da hiperglicemia pode funcionar como um mecanismo de defesa em resposta ao estresse oxidativo causado pela condição hiperglicêmica.

#### *6.1.5 Mecanismos moleculares envolvidos nos eventos centrais decorrentes da ausência de insulina periférica*

Alterações epigenéticas são definidas como modificações hereditárias na expressão de genes que não podem ser explicados por alterações na sequência do DNA (CHRISTENSEN e MARSIT, 2011; PETERS et al., 2011). A metilação do DNA é uma das principais modificações epigenéticas que controla a expressão de genes em estados fisiológicos e patológicos. Alterações no perfil da metilação do DNA podem ocorrer durante o envelhecimento e em estados patológicos como no câncer e doenças metabólicas, como é o caso do DM (BARRES e ZIERATH, 2011; EL-OSTA et al., 2008). Como mencionado previamente a glicose é considerada um dos principais fatores que regulam a expressão de genes, mediante a modulação de processos como a acetilação e metilação de diversos resíduos de histonas de genes que regulam o metabolismo energético (BURKE et al., 2009; BUSE et al., 2007). No presente estudo, observou-se um aumento da metilação global do DNA em hipocampo de animais hiperglicêmicos e estas alterações foram prevenidas com a terapia com insulina exógena. Este aumento na metilação do DNA pode ser devido ao aumento da atividade das enzimas lisina e arginina metiltransferase, que são enzimas que participam da metilação de histonas em resíduos de lisina e arginina e estão diretamente envolvidos em processos epigenéticos decorrentes da hiperglicemia (CARABELLI et al., 2011). O aumento da metilação do DNA causado pela hiperglicemia tem sido observado em diversos estudos na literatura e parece ocorrer também em nível sistêmico. Pesquisas relatam que o aumento da atividade destas metiltransferases em condições de hiperglicemia tem causado alterações epigenéticas através da hipermetilação do DNA em células endoteliais, monócitos, fígado e células pancreáticas (BRASACCHIO et al., 2009; COLCA, 2006; EL-OSTA et al., 2008; PIROLA et al., 2010; WILLIAMSON et al., 2012). Sendo assim, tem-se observado que a hipermetilação em resíduos de

histonas como na histona H3, está diretamente envolvida com o aumento da expressão do NFκB que tem papel chave na expressão de diversos genes pró-inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento das principais complicações vasculares no diabetes (KEATING e EL-OSTA, 2012; SIEBEL et al., 2010; TONNA et al., 2010). Assim, pode se propor que as alterações epigenéticas induzidas por hiperglicemia crônica poderiam ser em parte responsáveis pelas alterações energéticas e oxidativas identificadas neste modelo.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos formular as seguintes conclusões *i)* no cérebro existe um metabolismo de síntese, produção e sinalização de insulina independente do periférico e com objetivos diferentes; *ii)* o controle da glicemia mediante a administração de insulina previne das alterações epigenéticas decorrentes da hipermetilação do DNA, independente de se essa normalização não aconteça de forma precoce, fator que parcialmente concordaria com o efeito de *memória metabólica*; *iii)* a melhor caracterização do modelo de hiperglicemia induzido por STZ aqui realizada permitirá a sua utilização em novas situações metabólicas, por exemplo, no estudo dos efeitos desencadeados pela hiperinsulinemia dissociada de hiperglicemia e hiperlipidemia, sobre o metabolismo.

## 8 PERSPECTIVAS

- Investigar parâmetros de respiração e de morfometria mitocondrial em bulbo olfatório, córtex cerebral e hipocampo de ratos hiperglicêmicos.
- Investigar a produção endógena de insulina mediante o uso de extração com solventes orgânicos e posterior concentração por liofilização, e mediante a identificação de identificação vesículas contendo insulina por microscopia eletrônica em bulbo olfatório, córtex cerebral e hipocampo de ratos hiperglicêmicos.
- Investigar os efeitos da hiperglicemia crônica a nível de DNA através da determinação da metilação global do DNA em bulbo olfatório de ratos Wistar.
- Investigar se as alteração na expressão gênica (mRNA) e da sinalização de insulina encontradas no hipocampo são mantidas no bulbo olfatório de ratos hiperglicêmicos.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, M. A.; WELLS, D. G. and FALLON, J. R. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. **J Neurosci**, v. 19, n. 17, p. 7300-8, 1999.
- Abstracts of the 6th International Congress of the Immunology of Diabetes Society and American Diabetes Association Research Symposium. October 3-6, 2002, Copper Mountain, Colorado, USA. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 18 Suppl 4, p. S1-45, 2002.
- ADCOCK, I. M.; FORD, P.; ITO, K. and BARNES, P. J. Epigenetics and airways disease. **Respir Res**, v. 7, p. 21, 2006.
- ALBERTI, K. G. and ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med**, v. 15, n. 7, p. 539-53, 1998.
- ASHE, K. H. Synaptic structure and function in transgenic APP mice. **Ann N Y Acad Sci**, v. 924, p. 39-41, 2000.
- ATKINSON, M. A. and EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 221-9, 2001.
- BANKS, W. A. The source of cerebral insulin. **Eur J Pharmacol**, v. 490, n. 1-3, p. 5-12, 2004.
- BANKS, W. A.; JASPAN, J. B. and KASTIN, A. J. Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. **Peptides**, v. 18, n. 8, p. 1257-62, 1997.
- BARRES, R. and ZIERATH, J. R. DNA methylation in metabolic disorders. **Am J Clin Nutr**, v. 93, n. 4, p. 897S-900, 2011.
- BASKIN, D. G.; FIGLEWICZ, D. P.; WOODS, S. C.; PORTE, D., JR. and DORSA, D. M. Insulin in the brain. **Annu Rev Physiol**, v. 49, p. 335-47, 1987.
- BAURA, G. D.; FOSTER, D. M.; PORTE, D., JR.; KAHN, S. E.; BERGMAN, R. N.; COBELLI, C. and SCHWARTZ, M. W. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. **J Clin Invest**, v. 92, n. 4, p. 1824-30, 1993.

- BENCOSME, S. A. Cytology of islet cells in alloxan diabetic rabbits. **Am J Pathol**, v. 31, n. 6, p. 1149-63, 1955.
- BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A. and LANDER, E. S. The mammalian epigenome. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 669-81, 2007.
- BIJUR, G. N. and JOPE, R. S. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. **J Neurochem**, v. 87, n. 6, p. 1427-35, 2003.
- BRADFORD, R. K. and SCHUMACHER, R. A. and ADAMS, G. and AMARYAN, M. J. and AMBROZEWICZ, P. and ANCIANT, E. and ANGHINOLFI, M. and ASAVAPIBHOP, B. and ASRYAN, G. and AUDIT, G. and AVAKIAN, H. and BAGDASARYAN, H. and BAILLIE, N. and BALL, J. P. and BALTZELL, N. A. and BARROW, S. and BATOURINE, V. and BATTAGLIERI, M. and BEARD, K. and BEDLINSKIY, I. and BEKTASOGLU, M. and BELLIS, M. and BENMOUNA, N. and BERMAN, B. L. and BIANCHI, N. and BISELLI, A. S. and BONNER, B. E. and BOUCHIGNY, S. and BOIARINOV, S. and BRANFORD, D. and BRISCOE, W. J. and BROOKS, W. K. and BULTMANN, S. and BURKERT, V. D. and BUTUCEANU, C. and CALARCO, J. R. and CARECCIA, S. L. and CARMAN, D. S. and CARNAHAN, B. and CHEN, S. and COLE, P. L. and COLEMAN, A. and COLLINS, P. and COLTHARP, P. and CORDS, D. and CORVISIERO, P. and CRABB, D. and CRANNELL, H. and CREDE, V. and CUMMINGS, J. P. and DE MASI, R. and DE SANCTIS, E. and DE VITA, R. and DEGTYARENKO, P. V. and DENIZLI, H. and DENNIS, L. and DEUR, A. and DHARMAWARDANE, K. V. and DICKSON, R. and DJALALI, C. and DODGE, G. E. and DONNELLY, J. and DOUGHTY, D. and DRAGOVITSCH, P. and DUGGER, M. and DYTMAN, S. and DZYUBAK, O. P. and EGIYAN, H. and EGIYAN, K. S. and EL FASSI, L. and ELOUADRHIRI, L. and EMPL, A. and EUGENIO, P. and FATEMI, R. and FEDOTOV, G. and FELDMAN, G. and FEUERBACH, R. J. and FOREST, T. A. and FUNSTEN, H. and GARCON, M. and GAVALIAN, G. and GILFOYLE, G. P. and GIOVANETTI, K. L. and GIROD, F. X. and GOETZ, J. T. and GONENC, A. and GOTHE, R. W. and GRIFFIOEN, K. A. and GUIDAL, M. and GUILLO, M. and GULER, N. and GUO, L. and GYURJYAN, V. and HADJIDAKIS, C. and HAFIDI, K. and HAKOBYAN, H. and HAKOBYAN, R. S. and HARDIE, J. and HEDDLE, D. and HERSMAN, F. W. and HICKS, K. and HLEIQAWI, I. and HOLTROP, M. and HU, J. and HUERTAS, M. and HYDE-WRIGHT, C. E. and ILIEVA, Y. and

IRELAND, D. G. and ISHKHANOV, B. S. and ISUPOV, E. L. and ITO, M. M. and JENKINS, D. and JO, H. S. and JOO, K. and JUENGST, H. G. and KALANTARIANS, N. and KELLIE, J. D. and KHANDAKER, M. and KIM, K. Y. and KIM, K. and KIM, W. and KLEIN, A. and KLEIN, F. J. and KLUSMAN, M. and KOSSOV, M. and KRAMER, L. H. and KUBAROVSKY, V. and KUHN, J. and KUHN, S. E. and KULESHOV, S. V. and LACHNIET, J. and LAGET, J. M. and LANGHEINRICH, J. and LAWRENCE, D. and LIMA, A. C. S. and LIVINGSTON, K. and LU, H. Y. and LUKASHIN, K. and MACCORMICK, M. and MANAK, J. J. and MARCHAND, C. and MARKOV, N. and MCALEER, S. and MCKINNON, B. and MCNABB, J. W. C. and MECKING, B. A. and MESTAYER, M. D. and MEYER, C. A. and MIBE, T. and MIKHAILOV, K. and MIRAZITA, M. and MISKIMEN, R. and MOKEEV, V. and MORIYA, K. and MORROW, S. A. and MOTEABBED, M. and MUCCIFORA, V. and MUELLER, J. and MUTCHLER, G. S. and NADEL-TURONSKI, P. and NAPOLITANO, J. and NASSERIPOUR, R. and NATASHA, N. and NICCOLAI, S. and NICULESCU, G. and NICULESCU, I. and NICZYPORUK, B. B. and NIROULA, M. R. and NIYAZOV, R. A. and NOZAR, M. and O'RIELLY, G. V. and OSIPENKO, M. and OSTROVIDOV, A. I. and PARK, K. and PASYUK, E. and PATERSON, C. and PHILIPS, S. A. and PIERCE, J. and PIVNYUK, N. and POCANIC, D. and POGORELKO, O. and POLLI, E. and POPA, I. and POZDNIAKOV, S. and PREEDOM, B. M. and PRICE, J. W. and PROK, Y. and PROTOPODESCU, D. and QIN, L. M. and QUINN, B. P. and RAUE, B. A. and RICCARDI, G. and RICCO, G. and RIPANI, M. and RITCHIE, B. G. and RONCHETTI, F. and ROSNER, G. and ROSSI, P. and ROWNTREE, D. and RUBIN, P. D. and SABATIE, F. and SALAMANCA, J. and SALGADO, C. and SANTORO, J. P. and SAPUNENKO, V. and SEROV, V. S. and SHAFI, A. and SHARABIAN, Y. G. and SHAW, J. and SHVEDUNOV, N. V. and SIMIONATTO, S. and SKABELIN, A. V. and SMITH, E. S. and SMITH, L. C. and SOBER, D. I. and SOKHAN, D. and SPRAKER, M. and STAVINSKY, A. and STEPANYAN, S. S. and STEPANYAN, S. and STOKES, B. E. and STOLER, P. and STRAKOVSKY, I. I. and STRAUCH, S. and TAIUTI, M. and TAYLOR, S. and TEDESCHI, D. J. and THOMA, U. and THOMPSON, R. and TKABLADZE, A. and TKACHENKO, S. and TODOR, L. and TUR, C. and UNGARO, M. and VINEYARD, M. F. and VLASSOV, A. V. and WANG, K. and WATTS, D. P. and WEINSTEIN, L. B. and WELLER, H. and WEYGAND, D. P. and WILLIAMS, M. and

- WOLIN, E. and WOOD, M. H. and YEGNESWARAN, A. and YUN, J. and ZANA, L. and ZHANG, J. and ZHAO, B. and ZHAO, Z. W. and COLLABORATION, C. First measurement of beam-recoil observables C-x and C-z in hyperon photoproduction. **Physical Review C**, v. 75, n. 3, p. -, 2007.
- BRASACCHIO, D.; OKABE, J.; TIKELLIS, C.; BALCERCZYK, A.; GEORGE, P.; BAKER, E. K.; CALKIN, A. C.; BROWNLEE, M.; COOPER, M. E. and EL-OSTA, A. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. **Diabetes**, v. 58, n. 5, p. 1229-36, 2009.
- BRAVATA, D. M.; WELLS, C. K.; CONCATO, J.; KERNAN, W. N.; BRASS, L. M. and GULANSKI, B. I. Two measures of insulin sensitivity provided similar information in a U.S. population. **J Clin Epidemiol**, v. 57, n. 11, p. 1214-7, 2004.
- BRIGHTBILL, H. D.; PLEVY, S. E.; MODLIN, R. L. and SMALE, S. T. A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. **J Immunol**, v. 164, n. 4, p. 1940-51, 2000.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-20, 2001.
- BURKE, S. J.; COLLIER, J. J. and SCOTT, D. K. cAMP prevents glucose-mediated modifications of histone H3 and recruitment of the RNA polymerase II holoenzyme to the L-PK gene promoter. **J Mol Biol**, v. 392, n. 3, p. 578-88, 2009.
- BUSE, J. B.; GINSBERG, H. N.; BAKRIS, G. L.; CLARK, N. G.; COSTA, F.; ECKEL, R.; FONSECA, V.; GERSTEIN, H. C.; GRUNDY, S.; NESTO, R. W.; PIGNONE, M. P.; PLUTZKY, J.; PORTE, D.; REDBERG, R.; STITZEL, K. F.; STONE, N. J.; AMERICAN HEART, A. and AMERICAN DIABETES, A. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p. 162-72, 2007.
- CARABELLI, J.; BURGUENO, A. L.; ROSSELLI, M. S.; GIANOTTI, T. F.; LAGO, N. R.; PIROLA, C. J. and SOOKOIAN, S. High fat diet-induced liver steatosis promotes an increase in liver mitochondrial biogenesis in response to hypoxia. **J Cell Mol Med**, v. 15, n. 6, p. 1329-1338, 2011.

- CEFALU, W. T. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 226, n. 1, p. 13-26, 2001.
- CERIELLO, A.; IHNAT, M. A. and THORPE, J. E. Clinical review 2: The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 2, p. 410-5, 2009.
- CHIU, S. L.; CHEN, C. M. and CLINE, H. T. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. **Neuron**, v. 58, n. 5, p. 708-19, 2008.
- CHRISTENSEN, B. C. and MARSIT, C. J. Epigenomics in environmental health. **Front Genet**, v. 2, p. 84, 2011.
- CHUN, K. H.; CHOI, K. D.; LEE, D. H.; JUNG, Y.; HENRY, R. R.; CIARALDI, T. P. and KIM, Y. B. In vivo activation of ROCK1 by insulin is impaired in skeletal muscle of humans with type 2 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, n. 3, p. E536-42, 2011.
- COLCA, J. 66th Annual Meeting of the American Diabetes Association: 9 - 13 June 2006, Washington DC, USA. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 15, n. 9, p. 1119-23, 2006.
- COMBETTES-SOUVERAIN, M. and ISSAD, T. Molecular basis of insulin action. **Diabetes Metab**, v. 24, n. 6, p. 477-89, 1998.
- COTMAN, C. W. and BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 295-301, 2002.
- D'ERCOLE, A. J.; YE, P.; CALIKOGLU, A. S. and GUTIERREZ-OSPINA, G. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. **Mol Neurobiol**, v. 13, n. 3, p. 227-55, 1996.
- DE FELICE, F. G.; VIEIRA, M. N.; BOMFIM, T. R.; DECKER, H.; VELASCO, P. T.; LAMBERT, M. P.; VIOLA, K. L.; ZHAO, W. Q.; FERREIRA, S. T. and KLEIN, W. L. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of A $\beta$  oligomers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 6, p. 1971-6, 2009.
- DE LA MONTE, S. M. and WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. **J Diabetes Sci Technol**, v. 2, n. 6, p. 1101-13, 2008.
- DE PAUL, A. L.; BONATERRA, M.; PELLIZAS, C. G.; AOKI, A. and TORRES, A. I. Prolactin-releasing activity of GHRP-5 (Momany peptide) on lactotrophs in vivo and in vitro. **Biocell**, v. 26, n. 1, p. 49-60, 2002.



- DECHANT, G. and BARDE, Y. A. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 11, p. 1131-6, 2002.
- DEERING, T. G.; OGIHARA, T.; TRACE, A. P.; MAIER, B. and MIRMIRA, R. G. Methyltransferase Set7/9 maintains transcription and euchromatin structure at islet-enriched genes. **Diabetes**, v. 58, n. 1, p. 185-93, 2009.
- DEVASKAR, S. U.; GIDDINGS, S. J.; RAJAKUMAR, P. A.; CARNAGHI, L. R.; MENON, R. K. and ZAHM, D. S. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. **J Biol Chem**, v. 269, n. 11, p. 8445-54, 1994.
- DIEHL, K. H.; HULL, R.; MORTON, D.; PFISTER, R.; RABEMAMPIANINA, Y.; SMITH, D.; VIDAL, J. M. and VAN DE VORSTENBOSCH, C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **J Appl Toxicol**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.
- DOUGHERTY, K. D. and MILNER, T. A. p75NTR immunoreactivity in the rat dentate gyrus is mostly within presynaptic profiles but is also found in some astrocytic and postsynaptic profiles. **J Comp Neurol**, v. 407, n. 1, p. 77-91, 1999.
- DUCASSE, M. and BROWN, M. A. Epigenetic aberrations and cancer. **Mol Cancer**, v. 5, p. 60, 2006.
- EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A. and JONES, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457-63, 2004.
- EL-OSTA, A.; BRASACCHIO, D.; YAO, D.; POCAI, A.; JONES, P. L.; ROEDER, R. G.; COOPER, M. E. and BROWNLEE, M. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. **J Exp Med**, v. 205, n. 10, p. 2409-17, 2008.
- ELLIOTT, J. I.; DEWCHAND, H. and ALTMANN, D. M. Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking alphabeta T cells. **Clin Exp Immunol**, v. 109, n. 1, p. 116-20, 1997.
- ERECINSKA, M.; NELSON, D.; YUDKOFF, M. and SILVER, I. A. Energetics of the nerve terminal in relation to central nervous system function. **Biochem Soc Trans**, v. 22, n. 4, p. 959-65, 1994.
- ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **N Engl J Med**, v. 358, n. 11, p. 1148-59, 2008.

- FERRANNINI, E.; STERN, M. P.; GALVAN, A. Q.; MITCHELL, B. D. and HAFFNER, S. M. Impact of associated conditions on glycemic control of NIDDM patients. **Diabetes Care**, v. 15, n. 4, p. 508-14, 1992.
- FICK, L. J. and BELSHAM, D. D. Nutrient sensing and insulin signaling in neuropeptide-expressing immortalized, hypothalamic neurons: A cellular model of insulin resistance. **Cell Cycle**, v. 9, n. 16, p. 3186-93, 2010.
- FISKUM, G.; MURPHY, A. N. and BEAL, M. F. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 19, n. 4, p. 351-69, 1999.
- FOLMER, V.; SOARES, J. C. and ROCHA, J. B. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, n. 10, p. 1279-85, 2002.
- FRADIN, D.; LE FUR, S.; MILLE, C.; NAOUI, N.; GROVES, C.; ZELENKA, D.; MCCARTHY, M. I.; LATHROP, M. and BOUGNERES, P. Association of the CpG methylation pattern of the proximal insulin gene promoter with type 1 diabetes. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36278, 2012.
- FRICOVSKY, E. S.; SUAREZ, J.; IHM, S. H.; SCOTT, B. T.; SUAREZ-RAMIREZ, J. A.; BANERJEE, I.; TORRES-GONZALEZ, M.; WANG, H.; ELLROTT, I.; MAYA-RAMOS, L.; VILLARREAL, F. and DILLMANN, W. H. Excess protein O-GlcNAcylation and the progression of diabetic cardiomyopathy. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 303, n. 7, p. R689-99, 2012.
- GARCIA-CAO, I.; SONG, M. S.; HOBBS, R. M.; LAURENT, G.; GIORGI, C.; DE BOER, V. C.; ANASTASIOU, D.; ITO, K.; SASAKI, A. T.; RAMEH, L.; CARRACEDO, A.; VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; PINTON, P.; HAIGIS, M. C. and PANDOLFI, P. P. Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 49-62, 2012.
- GOTO, Y.; BERELOWITZ, M. and FROHMAN, L. A. Acute effects of alloxan- and streptozotocin-induced insulin deficiency on somatostatin and glucagon secretion by the perfused isolated rat pancreatico-duodenal preparation. **Diabetologia**, v. 20, n. 1, p. 66-71, 1981.
- GRUNBLATT, E.; SALKOVIC-PETRISIC, M.; OSMANOVIC, J.; RIEDERER, P. and HOYER, S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. **J Neurochem**, v. 101, n. 3, p. 757-70, 2007.

- GULEN, S. and DINCER, S. Effects of leptin on oxidative stress in healthy and Streptozotocin-induced diabetic rats. **Mol Cell Biochem**, v. 302, n. 1-2, p. 59-65, 2007.
- GUYTON, A. C. Tratado de Fisiologia Médica. **Elsevier**, v. 11, 2006.
- HADISAPUTRO, S.; DJOKOMOELJANTO, R. R.; JUDIONO and SOESATYO, M. H. The effects of oral plain kefir supplementation on proinflammatory cytokine properties of the hyperglycemia Wistar rats induced by streptozotocin. **Acta Med Indones**, v. 44, n. 2, p. 100-4, 2012.
- HADOUR, G.; FERRERA, R.; SEBBAG, L.; FORRAT, R.; DELAYE, J. and DE LORGERIL, M. Improved myocardial tolerance to ischaemia in the diabetic rabbit. **J Mol Cell Cardiol**, v. 30, n. 9, p. 1869-75, 1998.
- HAN, Y.; RANDELL, E.; VASDEV, S.; GILL, V.; GADAG, V.; NEWHOOK, L. A.; GRANT, M. and HAGERTY, D. Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. **Mol Cell Biochem**, v. 305, n. 1-2, p. 123-31, 2007.
- HAVRANKOVA, J.; ROTH, J. and BROWNSTEIN, M. J. Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents. **J Clin Invest**, v. 64, n. 2, p. 636-42, 1979.
- HAVRANKOVA, J.; SCHMECHEL, D.; ROTH, J. and BROWNSTEIN, M. Identification of insulin in rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 11, p. 5737-41, 1978.
- HAYES, V. Y.; TOWNER, M. D. and ISACKSON, P. J. Organization, sequence and functional analysis of a mouse BDNF promoter. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 45, n. 2, p. 189-98, 1997.
- HILDRETH, K. L.; VAN PELT, R. E. and SCHWARTZ, R. S. Obesity, Insulin Resistance, and Alzheimer's Disease. **Obesity**, v. 20, n. 8, p. 1549-1557, 2012.
- HUISAMEN, B.; DIETRICH, D.; BEZUIDENHOUT, N.; LOPES, J.; FLEPISI, B.; BLACKHURST, D. and LOCHNER, A. Early cardiovascular changes occurring in diet-induced, obese insulin-resistant rats. **Mol Cell Biochem**, v. 368, n. 1-2, p. 37-45, 2012.
- IHNAT, M. A.; THORPE, J. E. and CERIELLO, A. Hypotesis: the "metabolic memory", the new challenge of diabetes. **Diabetic Med**, v. 24, p. 582-586, 2006.
- JELLINGER, K. A. Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research. **J Neural Transm**, v. 113, n. 11, p. 1603-23, 2006.

KADOWAKI, S.; TAMINATO, T.; CHIBA, T.; GOTO, Y.; NOZAWA, M.; SEINO, Y.; MATSUKURA, S. and FUJITA, T. Somatostatin release from the isolated, perfused diabetic rat pancreas: inverse relationship between pancreatic somatostatin and insulin. **Diabetes**, v. 29, n. 12, p. 960-3, 1980.

KAHN, S. E.; HULL, R. L. and UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-6, 2006.

KASUGA, M.; ZICK, Y.; BLITHE, D. L.; CRETIAZ, M. and KAHN, C. R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. **Nature**, v. 298, n. 5875, p. 667-9, 1982.

KEATING, S. T. and EL-OSTA, A. Chromatin modifications associated with diabetes. **J Cardiovasc Transl Res**, v. 5, n. 4, p. 399-412, 2012.

KERNIE, S. G.; LIEBL, D. J. and PARADA, L. F. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. **EMBO J**, v. 19, n. 6, p. 1290-300, 2000.

KILPATRICK, E. S.; RIGBY, A. S. and ATKIN, S. L. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 707-12, 2007.

KOWLURU, R. A. and ODENBACH, S. Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. **Diabetes**, v. 53, n. 12, p. 3233-8, 2004.

KUKIDOME, D.; NISHIKAWA, T.; SONODA, K.; IMOTO, K.; FUJISAWA, K.; YANO, M.; MOTOSHIMA, H.; TAGUCHI, T.; MATSUMURA, T. and ARAKI, E. Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. **Diabetes**, v. 55, n. 1, p. 120-7, 2006.

KURODA, A.; RAUCH, T. A.; TODOROV, I.; KU, H. T.; AL-ABDULLAH, I. H.; KANDEEL, F.; MULLEN, Y.; PFEIFER, G. P. and FERRERI, K. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e6953, 2009.

LAIRD, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 4, p. 253-66, 2003.

LANG, A. E. and LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 339, n. 15, p. 1044-53, 1998.

- LAVIOLA, L.; BELSANTI, G.; DAVALLI, A. M.; NAPOLI, R.; PERRINI, S.; WEIR, G. C.; GIORGINO, R. and GIORGINO, F. Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. **Diabetes**, v. 50, n. 12, p. 2709-20, 2001.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D. and COX, M. M. Principles of Biochemistry. p. 698, 2004.
- LING, C. and GROOP, L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 58, n. 12, p. 2718-25, 2009.
- LOPEZ, J.; PERCHARDE, M.; COLEY, H. M.; WEBB, A. and CROOK, T. The context and potential of epigenetics in oncology. **Br J Cancer**, v. 100, n. 4, p. 571-7, 2009.
- MACDONALD, R. S. and KLURFELD, D. M. Diet, growth factors and cancer: introduction to the symposium proceedings. **J Nutr**, v. 132, n. 12, p. 3797S-3798S, 2002.
- MACHIDA, M.; FUJIMAKI, S.; HIDAKA, R.; ASASHIMA, M. and KUWABARA, T. The insulin regulatory network in adult hippocampus and pancreatic endocrine system. **Stem Cells Int**, v. 2012, p. 959737, 2012.
- MAIER, S. and OLEK, A. Diabetes: a candidate disease for efficient DNA methylation profiling. **J Nutr**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2440S-2443S, 2002.
- MALECKI, M. and SKUPIEN, J. Problems in differential diagnosis of diabetes types. **Pol Arch Med Wewn**, v. 118, n. 7-8, p. 435-40, 2008.
- MALECKI, M. T. and KLUPA, T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. **Pharmacol Rep**, v. 57 Suppl, p. 20-32, 2005.
- MALTA, D. C.; OLIVEIRA, M. R.; MOURA, E. C.; SILVA, S. A.; ZOUAIN, C. S.; SANTOS, F. P.; MORAIS NETO, O. L. and PENNA GDE, O. [Prevalence of risk health behavior among members of private health insurance plans: results from the 2008 national telephone survey Vigitel, Brazil]. **Cien Saude Colet**, v. 16, n. 3, p. 2011-22, 2011.
- MANFREDI, G. and BEAL, M. F. The role of mitochondria in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Brain Pathol**, v. 10, n. 3, p. 462-72, 2000.
- MARCHETTI, P.; DOTTA, F.; LAURO, D. and PURRELLO, F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. **Regul Pept**, v. 146, n. 1-3, p. 4-11, 2008.

MARTIN, E. D.; SANCHEZ-PEREZ, A.; TREJO, J. L.; MARTIN-ALDANA, J. A.; CANO JAIMEZ, M.; PONS, S.; ACOSTA UMANZOR, C.; MENES, L.; WHITE, M. F. and BURKS, D. J. IRS-2 Deficiency impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation. **Cereb Cortex**, v. 22, n. 8, p. 1717-27, 2012.

MATTHEWS, D. R. Insulin resistance and beta-cell function--a clinical perspective. **Diabetes Obes Metab**, v. 3 Suppl 1, p. S28-33, 2001.

MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, A. S.; NAYLOR, B. A.; TREACHER, D. F. and TURNER, R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-9, 1985.

MCCARREN, M. American Diabetes Association Resource Guide 2003. Class action: type 2 pills update. **Diabetes Forecast**, v. 56, n. 1, p. 44-7, 2003.

MOOTHA, V. K.; LINDGREN, C. M.; ERIKSSON, K. F.; SUBRAMANIAN, A.; SIHAG, S.; LEHAR, J.; PUIGSERVER, P.; CARLSSON, E.; RIDDERSTRALE, M.; LAURILA, E.; HOUSTIS, N.; DALY, M. J.; PATTERSON, N.; MESIROV, J. P.; GOLUB, T. R.; TAMAYO, P.; SPIEGELMAN, B.; LANDER, E. S.; HIRSCHHORN, J. N.; ALTSHULER, D. and GROOP, L. C. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nat Genet**, v. 34, n. 3, p. 267-73, 2003.

MORGENZTERN, D. and MCLEOD, H. L. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. **Anticancer Drugs**, v. 16, n. 8, p. 797-803, 2005.

MORINI, M.; ROCCATAGLIATA, L.; DELL'EVA, R.; PEDEMONTE, E.; FURLAN, R.; MINGHELLI, S.; GIUNTI, D.; PFEFFER, U.; MARCHESE, M.; NOONAN, D.; MANCARDI, G.; ALBINI, A. and UCCELLI, A. Alpha-lipoic acid is effective in prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, v. 148, n. 1-2, p. 146-53, 2004.

MOWLA, S. J.; PAREEK, S.; FARHADI, H. F.; PETRECCA, K.; FAWCETT, J. P.; SEIDAH, N. G.; MORRIS, S. J.; SOSSIN, W. S. and MURPHY, R. A. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. **J Neurosci**, v. 19, n. 6, p. 2069-80, 1999.

MUKHERJEE, B.; ANBAZHAGAN, S.; ROY, A.; GHOSH, R. and CHATTERJEE, M. Novel implications of the potential role of selenium

- on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. **Biomed Pharmacother**, v. 52, n. 2, p. 89-95, 1998.
- MURPHY, A. N.; FISKUM, G. and BEAL, M. F. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 19, n. 3, p. 231-45, 1999.
- NATHAN, D. M.; CLEARY, P. A.; BACKLUND, J. Y.; GENUTH, S. M.; LACHIN, J. M.; ORCHARD, T. J.; RASKIN, P. and ZINMAN, B. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **N Engl J Med**, v. 353, n. 25, p. 2643-53, 2005.
- NEMOTO, S.; KOBAYASHI, T.; TAGUCHI, K.; MATSUMOTO, T. and KAMATA, K. Losartan improves aortic endothelium-dependent relaxation via proline-rich tyrosine kinase 2/Src/Akt pathway in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 6, p. H2383-94, 2011.
- NICHOLLS, D. G. and BUDD, S. L. Mitochondria and neuronal survival. **Physiol Rev**, v. 80, n. 1, p. 315-60, 2000.
- NUKATSUKA, M.; YOSHIMURA, Y.; NISHIDA, M. and KAWADA, J. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. **J Pharmacobiodyn**, v. 13, n. 4, p. 259-62, 1990.
- OHARA, T.; DOI, Y.; NINOMIYA, T.; HIRAKAWA, Y.; HATA, J.; IWAKI, T.; KANBA, S. and KIYOHARA, Y. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. **Neurology**, v. 77, n. 12, p. 1126-34, 2011.
- ONO, M.; ICHIHARA, J.; NONOMURA, T.; ITAKURA, Y.; TAIJI, M.; NAKAYAMA, C. and NOGUCHI, H. Brain-derived neurotrophic factor reduces blood glucose level in obese diabetic mice but not in normal mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 238, n. 2, p. 633-7, 1997.
- OOSAWA, Y.; ASHCROFT, S. J. and ASHCROFT, F. M. Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels from an insulin-secreting cell line incorporated into planar lipid bilayers. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 619-23, 1992.
- PATRO, S. C. and MONTANER, L. J. Editorial: Is HIV-1 induction of macrophage expression of PD-L1 and PD-L2 its weakest or strongest link to disease? HIV-1 plays both sides by augmenting and limiting T cell activation to survive in vivo. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 4, p. 495-8, 2011.
- PETERS, A.; LAFFEL, L. and AMERICAN DIABETES ASSOCIATION TRANSITIONS WORKING, G. Diabetes care for emerging adults: recommendations for transition from pediatric to adult diabetes care systems: a position statement of the American Diabetes

Association, with representation by the American College of Osteopathic Family Physicians, the American Academy of Pediatrics, the American Association of Clinical Endocrinologists, the American Osteopathic Association, the Centers for Disease Control and Prevention, Children with Diabetes, The Endocrine Society, the International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes, Juvenile Diabetes Research Foundation International, the National Diabetes Education Program, and the Pediatric Endocrine Society (formerly Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society). **Diabetes Care**, v. 34, n. 11, p. 2477-85, 2011.

PHAM, M. N.; HAWA, M. I.; PFLEGER, C.; RODEN, M.; SCHERNTHANER, G.; POZZILLI, P.; BUZZETTI, R.; SCHERBAUM, W. A.; SEISSLER, J.; KOLB, H.; HUNTER, S.; LESLIE, R. D.; SCHLOOT, N. C. and ACTION, L. S. G. Pro- and anti-inflammatory cytokines in latent autoimmune diabetes in adults, type 1 and type 2 diabetes patients: Action LADA 4. **Diabetologia**, v. 54, n. 7, p. 1630-8, 2011.

PIROLA, L.; BALCERCZYK, A.; OKABE, J. and EL-OSTA, A. Epigenetic phenomena linked to diabetic complications. **Nat Rev Endocrinol**, v. 6, n. 12, p. 665-75, 2010.

POITOUT, V. and ROBERTSON, R. P. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 339-42, 2002.

PRADA, P. O.; ZECCHIN, H. G.; GASPARETTI, A. L.; TORSONI, M. A.; UENO, M.; HIRATA, A. E.; COREZOLA DO AMARAL, M. E.; HOER, N. F.; BOSCHERO, A. C. and SAAD, M. J. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1576-87, 2005.

RAFEHI, H.; EL-OSTA, A. and KARAGIANNIS, T. C. Epigenetic mechanisms in the pathogenesis of diabetic foot ulcers. **J Diabetes Complications**, v. 26, n. 6, p. 554-61, 2012.

REMOR, A. P.; DE MATOS, F. J.; GHISONI, K.; DA SILVA, T. L.; EIDT, G.; BURIGO, M.; DE BEM, A. F.; SILVEIRA, P. C.; DE LEON, A.; SANCHEZ, M. C.; HOHL, A.; GLASER, V.; GONCALVES, C. A.; QUINCOZES-SANTOS, A.; BORBA ROSA, R. and LATINI, A. Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: Involvement of advanced glycosylated end products. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 11, p. 1460-71, 2011.



RENARD, C. B.; KRAMER, F.; JOHANSSON, F.; LAMHARZI, N.; TANNOCK, L. R.; VON HERRATH, M. G.; CHAIT, A. and BORNFELDT, K. E. Diabetes and diabetes-associated lipid abnormalities have distinct effects on initiation and progression of atherosclerotic lesions. **J Clin Invest**, v. 114, n. 5, p. 659-68, 2004.

RITCHIE, K. and LOVESTONE, S. The dementias. **Lancet**, v. 360, n. 9347, p. 1759-66, 2002.

RORSMAN, P. and RENSTROM, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 46, n. 8, p. 1029-45, 2003.

ROSEN, P.; NAWROTH, P. P.; KING, G.; MOLLER, W.; TRITSCHLER, H. J. and PACKER, L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 17, n. 3, p. 189-212, 2001.

SALTIEL, A. R. and KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

SANDHOFER, A.; IGLSEDER, B.; PAULWEBER, B.; EBENBICHLER, C. F. and PATSCH, J. R. Comparison of different definitions of the metabolic syndrome. **Eur J Clin Invest**, v. 37, n. 2, p. 109-16, 2007.

SCHECHTER, R.; ABBOUD, M. and JOHNSON, G. Brain endogenous insulin effects on neurite growth within fetal rat neuron cell cultures. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 116, n. 2, p. 159-67, 1999.

SCHECHTER, R.; BEJU, D.; GAFFNEY, T.; SCHAEFER, F. and WHETSELL, L. Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immunoreaction are present within the rat fetal nervous system. **Brain Res**, v. 736, n. 1-2, p. 16-27, 1996.

SCHECHTER, R.; WHITMIRE, J.; WHEET, G. S.; BEJU, D.; JACKSON, K. W.; HARLOW, R. and GAVIN, J. R., 3RD. Immunohistochemical and in situ hybridization study of an insulin-like substance in fetal neuron cell cultures. **Brain Res**, v. 636, n. 1, p. 9-27, 1994.

SCHECHTER, R.; YANOVITCH, T.; ABBOUD, M.; JOHNSON, G., 3RD and GASKINS, J. Effects of brain endogenous insulin on neurofilament and MAPK in fetal rat neuron cell cultures. **Brain Res**, v. 808, n. 2, p. 270-8, 1998.

- SEAQUIST, E. R.; LATTEMANN, D. F. and DIXON, R. A. American Diabetes Association research symposium: diabetes and the brain. **Diabetes**, v. 61, n. 12, p. 3056-62, 2012.
- SEIDAH, N. G. and CHRETIEN, M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. **Brain Res**, v. 848, n. 1-2, p. 45-62, 1999.
- SHA, H.; XU, J.; TANG, J.; DING, J.; GONG, J.; GE, X.; KONG, D. and GAO, X. Disruption of a novel regulatory locus results in decreased Bdnf expression, obesity, and type 2 diabetes in mice. **Physiol Genomics**, v. 31, n. 2, p. 252-63, 2007.
- SHENG, W. S.; HU, S.; KRAVITZ, F. H.; PETERSON, P. K. and CHAO, C. C. Tumor necrosis factor alpha upregulates human microglial cell production of interleukin-10 in vitro. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 2, n. 5, p. 604-8, 1995.
- SIBLEY, S. D.; PALMER, J. P.; HIRSCH, I. B. and BRUNZELL, J. D. Visceral obesity, hepatic lipase activity, and dyslipidemia in type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 7, p. 3379-84, 2003.
- SIEBEL, A. L.; FERNANDEZ, A. Z. and EL-OSTA, A. Glycemic memory associated epigenetic changes. **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 12, p. 1853-9, 2010.
- SIGWALT, A. R.; BUDDE, H.; HELMICH, I.; GLASER, V.; GHISONI, K.; LANZA, S.; CADORE, E. L.; LHULLIER, F. L.; DE BEM, A. F.; HOHL, A.; DE MATOS, F. J.; DE OLIVEIRA, P. A.; PREDIGER, R. D.; GUGLIELMO, L. G. and LATINI, A. Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. **Neuroscience**, v. 192, p. 661-74, 2011.
- SILVER, I. and ERECINSKA, M. Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. **Adv Exp Med Biol**, v. 454, p. 7-16, 1998.
- SINGH, B. S.; RAJAKUMAR, P. A.; EVES, E. M.; ROSNER, M. R.; WAINER, B. H. and DEVASKAR, S. U. Insulin gene expression in immortalized rat hippocampal and pheochromocytoma-12 cell lines. **Regul Pept**, v. 69, n. 1, p. 7-14, 1997.
- STRANDELL, E.; EIZIRIK, D. L.; KORSGREN, O. and SANDLER, S. Functional characteristics of cultured mouse pancreatic islets following exposure to different streptozotocin concentrations. **Mol Cell Endocrinol**, v. 59, n. 1-2, p. 83-91, 1988.
- STRATHDEE, S. A.; HOGG, R. S.; O'SHAUGHNESSY, M. V.; MONTANER, J. S. and SCHECHTER, M. T. A decade of research on the

natural history of HIV infection: Part 2. Cofactors. **Clinical and Investigative Medicine-Medecine Clinique Et Experimentale**, v. 19, n. 2, p. 121-30, 1996.

SZYF, M.; PAKNESHAN, P. and RABBANI, S. A. DNA methylation and breast cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 68, n. 6, p. 1187-97, 2004.

TANIGUCHI, A.; FUKUSHIMA, M.; SAKAI, M.; KATAOKA, K.; NAGATA, I.; DOI, K.; ARAKAWA, H.; NAGASAKA, S.; TOKUYAMA, K. and NAKAI, Y. The role of the body mass index and triglyceride levels in identifying insulin-sensitive and insulin-resistant variants in Japanese non-insulin-dependent diabetic patients. **Metabolism**, v. 49, n. 8, p. 1001-5, 2000.

TENG, H. K.; TENG, K. K.; LEE, R.; WRIGHT, S.; TEVAR, S.; ALMEIDA, R. D.; KERMANI, P.; TORKIN, R.; CHEN, Z. Y.; LEE, F. S.; KRAEMER, R. T.; NYKJAER, A. and HEMPSTEAD, B. L. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. **J Neurosci**, v. 25, n. 22, p. 5455-63, 2005.

THE ACTION TO CONTROL CARDIOVASCULAR RISK IN DIABETES STUDY GROUP. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. **N Engl J Med**, v. 358, p. 2545-2559, 2008.

THE ADVANCE COLLABORATIVE GROUP. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. **N Engl J Med**, v. 358, p. 2560-2572, 2008.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 329, p. 977-986, 1993.

TODD, J. A. Etiology of type 1 diabetes. **Immunity**, v. 32, n. 4, p. 457-67, 2010.

TOMLINSON, D. R. and GARDINER, N. J. Diabetic neuropathies: components of etiology. **J Peripher Nerv Syst**, v. 13, n. 2, p. 112-21, 2008.

TONNA, S.; EL-OSTA, A.; COOPER, M. E. and TIKELLIS, C. Metabolic memory and diabetic nephropathy: potential role for epigenetic mechanisms. **Nat Rev Nephrol**, v. 6, n. 6, p. 332-41, 2010.

TWIG, G.; HYDE, B. and SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. **Biochim Biophys Acta**, v. 1777, n. 9, p. 1092-7, 2008.

- UNGER, J. W.; LIVINGSTON, J. N. and MOSS, A. M. Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. **Prog Neurobiol**, v. 36, n. 5, p. 343-62, 1991.
- VALENCIANO, A. I.; CORROCHANO, S.; DE PABLO, F.; DE LA VILLA, P. and DE LA ROSA, E. J. Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. **J Neurochem**, v. 99, n. 2, p. 524-36, 2006.
- VAN DER HEIDE, L. P.; RAMAKERS, G. M. and SMIDT, M. P. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. **Prog Neurobiol**, v. 79, n. 4, p. 205-21, 2006.
- VAN EXEL, E.; GUSSEKLOO, J.; DE CRAEN, A. J.; FROLICH, M.; BOOTSMA-VAN DER WIEL, A.; WESTENDORP, R. G. and LEIDEN 85 PLUS, S. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1088-92, 2002.
- WAN, Q.; XIONG, Z. G.; MAN, H. Y.; ACKERLEY, C. A.; BRAUNTON, J.; LU, W. Y.; BECKER, L. E.; MACDONALD, J. F. and WANG, Y. T. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. **Nature**, v. 388, n. 6643, p. 686-90, 1997.
- WANG, C. C.; GOALSTONE, M. L. and DRAZNIN, B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 2735-40, 2004.
- WANG, C. H.; WANG, C. C. and WEI, Y. H. Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1201, p. 157-65, 2010.
- WANG, W.; LEE, E. T.; FABSITZ, R.; WELTY, T. K. and HOWARD, B. V. Using HbA(1c) to improve efficacy of the american diabetes association fasting plasma glucose criterion in screening for new type 2 diabetes in American Indians: the strong heart study. **Diabetes Care**, v. 25, n. 8, p. 1365-70, 2002.
- WATSON, G. S.; CHOLERTON, B. A.; REGER, M. A.; BAKER, L. D.; PLYMATE, S. R.; ASTHANA, S.; FISHEL, M. A.; KULSTAD, J. J.; GREEN, P. S.; COOK, D. G.; KAHN, S. E.; KEELING, M. L. and CRAFT, S. Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. **Am J Geriatr Psychiatry**, v. 13, n. 11, p. 950-8, 2005.

- WHITE, M. F. and KAHN, C. R. The insulin signaling system. **J Biol Chem**, v. 269, n. 1, p. 1-4, 1994.
- WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R. and KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-53, 2004.
- WILLIAMSON, R.; MCNEILLY, A. and SUTHERLAND, C. Insulin resistance in the brain: an old-age or new-age problem? **Biochem Pharmacol**, v. 84, n. 6, p. 737-45, 2012.
- WINER, N. and SOWERS, J. R. Epidemiology of diabetes. **J Clin Pharmacol**, v. 44, n. 4, p. 397-405, 2004.
- IROSTKO, B.; WONG, T. Y. and SIMO, R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. **Prog Retin Eye Res**, v. 27, n. 6, p. 608-21, 2008.
- WOO, N. H.; TENG, H. K.; SIAO, C. J.; CHIARUTTINI, C.; PANG, P. T.; MILNER, T. A.; HEMPSTEAD, B. L. and LU, B. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 8, p. 1069-77, 2005.
- XU, B.; GOULDING, E. H.; ZANG, K.; CEPOI, D.; CONE, R. D.; JONES, K. R.; TECOTT, L. H. and REICHARDT, L. F. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 736-42, 2003.
- YAFFE, K.; BLACKWELL, T.; KANAYA, A. M.; DAVIDOWITZ, N.; BARRETT-CONNOR, E. and KRUEGER, K. Diabetes, impaired fasting glucose, and development of cognitive impairment in older women. **Neurology**, v. 63, n. 4, p. 658-63, 2004.
- YANG, C.; AYE, C. C.; LI, X.; DIAZ RAMOS, A.; ZORZANO, A. and MORA, S. Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. **Biosci Rep**, v. 32, n. 5, p. 465-78, 2012.
- ZHAO, W.; CHEN, H.; XU, H.; MOORE, E.; MEIRI, N.; QUON, M. J. and ALKON, D. L. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. **J Biol Chem**, v. 274, n. 49, p. 34893-902, 1999.
- ZHENG, X. K.; ZHANG, L.; WANG, W. W.; WU, Y. Y.; ZHANG, Q. B. and FENG, W. S. Anti-diabetic activity and potential mechanism of total flavonoids of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in rats induced by high fat diet and low dose STZ. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 1, p. 662-8, 2011.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. and SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-7, 2001.